

분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분 효소당화를 위한 Glucoamylase와 α -Amylase의 보완작용

이용현* · 박동찬

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Synergistic Effect of Glucoamylase and α -Amylase in Enzymatic Hydrolysis of Raw Corn Starch in an Agitated Bead Reaction System

Lee, Yong-Hyun* and Dong-Chan Park

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

The synergistic effect of glucoamylase and α -amylase on the hydrolysis of raw corn starch in an agitated bead reaction system was studied by investigating the changes of sugar profiles, the granular structure, particle size distribution, and X-ray diffraction pattern of residual raw corn starch. The enzymatic hydrolysis of raw corn starch was greatly enhanced by synergistic effect of glucoamylase and α -amylase. Even though the sugar profiles were mainly determined by the mixing ratio of glucoamylase and α -amylase; raw starch was mainly converted to glucose directly without accumulation of any significant amount of oligosaccharides. The cavity formation and fragmentation phenomena of raw corn starch granule subjected to enzyme reaction were analyzed by means of SEM and the particle size distribution. The X-ray diffraction pattern of raw starch was not changed at the initial stage of reaction but slightly changed at the late stage of hydrolysis, which may be caused by the preferential degradation of amorphous region by enzymatic reaction, not by the destruction of microcrystalline structure of raw corn starch.

각종 amylase에 의한 생전분의 분해양상은 사용 amylase의 종류와 기원, 그리고 전분질의 종류에 따라 특성이 결정된다(1-3). 각종 전분분해 효소의 생전분에 대한 susceptibility를 결정짓는 중요한 요인으로는 입자 표면적과 관련되는 전분입자에 대한 효소분자의 친화력, amylose-amylopectin의 결합형태, 그리고 전분입자의 결정화도(crystallinity)등이 있다(4).

분쇄마찰매체 효소반응계는 생전분의 효소당화시 분쇄마찰매체를 첨가하여 교반함으로써 분쇄마찰 효과를 주어 증가하지 않고도 생전분의 효소에 대한 susceptibility를 증가시켜 효소당화를 현저히 촉진시키는 무증자당

화법이다(5). 이는 기존의 에너지소모형 증자당화법을 대체할 수 있는 새로운 생전분당화법으로 특히 고농도-고순도의 포도당용액이 요구되는 HFCS 제조공정에 응용할 경우 잠재적인 가능성이 있다(6, 7).

전보(8)에서는 분쇄마찰매체 효소반응계에서 옥수수 생전분(raw corn starch)의 효소당화 촉진 mechanism을 규명하기 위하여, 순수분리된 glucoamylase와 α -amylase를 이용하여, 각 효소의 작용양상과 이에 따른 전분입자의 구조적 변화를 관찰하였다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서도 glucoamylase와 α -amylase의 작용 mechanism에는 큰 변동이 없어 매체를 첨가하지 않는 비교군과 생성당조성이 유사하였다. 분쇄마찰매체의 단순한 기계적 충격은 전분입자의 구조에 큰 변화를 주지는 못하였고 단지 입자의 균열을 유발하였다. 그러나 효

Key words: Enzymatic hydrolysis, raw corn starch, agitated bead reaction system, glucoamylase and α -amylase

*Corresponding author

소와 동시에 작용하면 생전분을 많은 작은 입자로 단편화시켜 효소의 작용이 가능한 가용표면적(accessible surface area)이 증가될 뿐만 아니라 생전분입자에 흡착된 효소의 양이 증가되어 효소당화가 현저히 촉진됨을 알았다. 전분질의 효소당화는 glucoamylase 또는 α -amylase와 같이 작용 mechanism이 상이한 amylase의 상호 보완작용에 의하여 주로 이루어진다(9).

본 연구에서는 분쇄마찰매체 효소반응계에서 옥수수 생전분을 기질로 하여 exo형인 glucoamylase와 endo형인 α -amylase의 혼합비를 변화시키면서 생성당의 조성을 경시적으로 비교하였고, 잔류생전분입자의 구조변화를 scanning electron microscopy, particle size distribution, 그리고 X-ray 회절 등으로 관찰하여 그 분해양상을 규명하였다. 이러한 연구는 분쇄마찰매체 효소반응계에 적합한 무증자 효소의 개발 방향과 보다 효율적인 분쇄마찰매체 효소반응계 개발에 필요한 기초적 자료가 된다.

재료 및 방법

사용전분

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

사용효소

본 실험에서 사용한 효소는 *Rhizopus*속 곰팡이에서 분리·정제된 Sigma사의 glucoamylase(Amyloglucosidase, Exo-1,4- α -glucosidase; EC 3.2.1.3)로서 specific activity는 2,940 unit/mg protein 였다. 또한 *Bacillus licheniformis* 유래의 α -amylase(1,4- α -D-glucan-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1)도 병용하였으며, specific activity는 680 unit/mg protein 였다(10).

분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서 생전분의 효소당화

생전분의 효소당화는 전분기질 220g/l(w/v)와 유리구(glass bead, 직경 3mm, 비중 2.54) 400g/l을 50mM sodium-citrate buffer(pH 4.4)에 현탁하고 glucoamylase 10,500 unit/l와 α -amylase 10,880 unit/l를 첨가하여 50°C에서 200 rpm으로 교반하면서 효소당화를 진행하였으며, 경우에 따라 상기 효소의 양을 일정한 비율로 증감하였다.

전분의 증자당화는 전분기질 220g/l(w/v)와 α -amylase 10,800 unit/l를 buffer에 현탁하고 90°C에서 20분간 액화한 후 50°C로 냉각하고 glucoamylase 10,880

unit/l를 첨가하여 당화하였다. 당분석시료 및 구조변화 규명을 위한 미당화 잔류전분시료는 전보(8)와 같이 준비하였다.

당분석

환원당은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)법(11)으로, glucose는 효소적 방법인 PGO(peroxidase glucose oxidase-o-parainisidine, Sigma Kit 510A)법(12)으로, 당 조성은 전보(8)에서와 같이 HPLC로 분석하였다.

Scanning electron microscope(SEM)을 이용한 전분입자의 구조관찰

구조변형을 방지하기 위하여 methanol-acetone으로 solvent drying시킨 잔류생전분을 백금으로 ion coating(Eiko IB-5 ion coater)시킨 후 scanning electron microscope(ESI-SS 130 SEM, Akashi Japan)로 그 형태변화를 관찰하였다.

Particle size distribution의 측정

잔류전분의 particle size distribution은 Elzone 280PC(Particle Data Inc., USA)에서 전기저항법으로 측정하였다. 이 때 분산상의 aggregation을 방지하기 위하여 시료를 2회 분산시켰으며 전해액은 9% NaCl 용액, 분산용매는 Triton X-100으로 30초간 분산시켜 측정하였다.

X-ray 회절양상

생전분의 X-ray 회절양상은 X-ray diffractometer(Rigaku Geigerflex 2301, Japan)로 30 kV, 15 mA에서 측정하였으며, 시료는 powder method로, Cu(K α) Ni-filter를 target으로 사용하였다. Slit 1°-0.3mm-1°, time constant 1, count range 1,000 cps, scanning speed 2°2 θ /min, chartspeed 20 mm/min의 조건으로 회절각도 5°에서 30°까지 주사하면서 측정하였다.

결과 및 고찰

분쇄마찰매체 효소반응계에서 glucoamylase와 α -amylase의 혼합비에 따른 생전분 효소당화 양상의 변화

Glucoamylase 사용량의 영향: 전분의 효소당화는 exo형인 glucoamylase와 endo형인 α -amylase의 상호보완작용에 의해서 크게 촉진된다(13-15). 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분 효소당화에 적합한 효소 혼합비를 규명코자, 먼저 endo형인 α -amylase의 사용량은

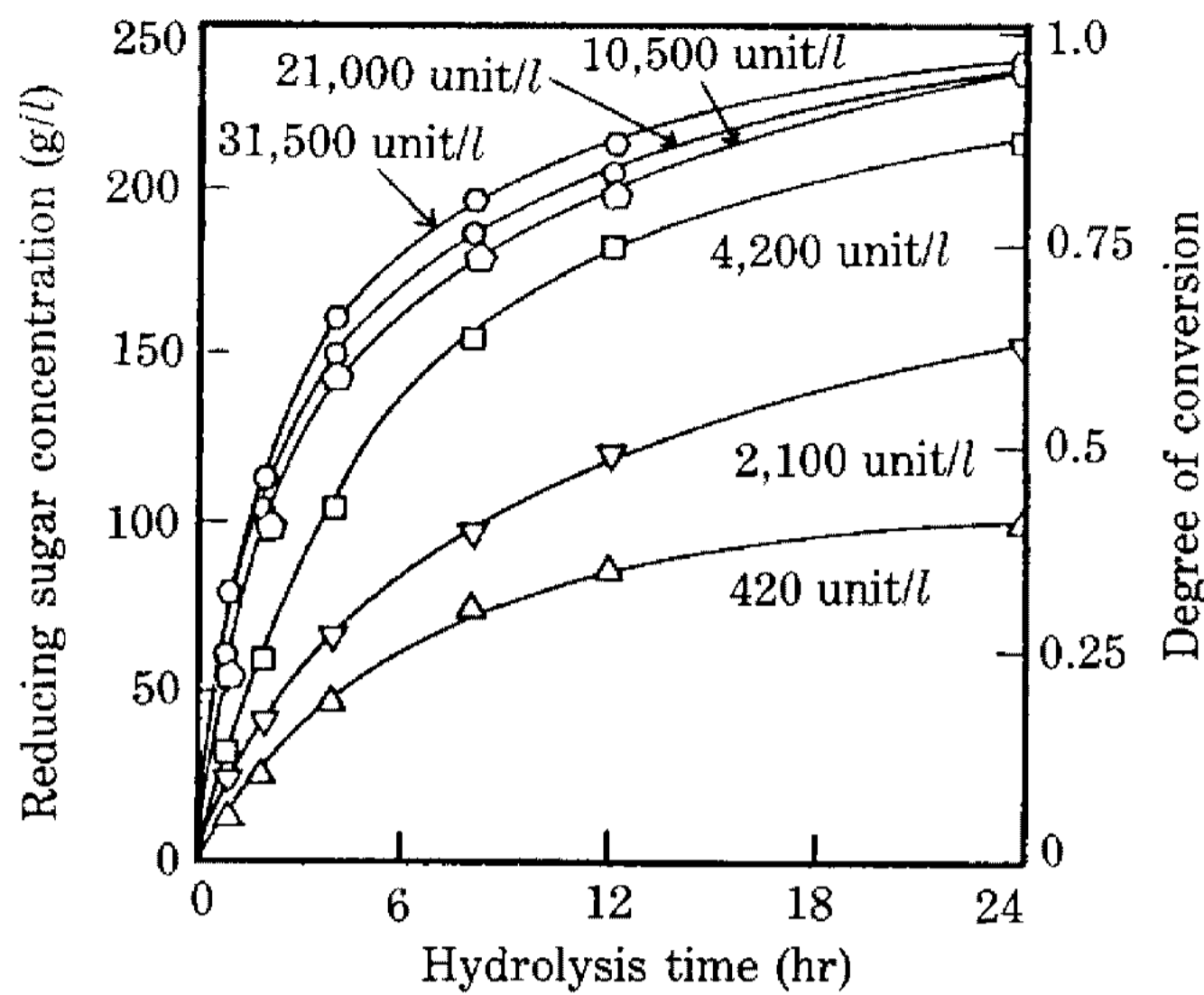


Fig. 1. Effect of glucoamylase dosage on the progress of hydrolysis of raw corn starch by mixed glucoamylase and α -amylase in an agitated bead reaction system. 220g/l (w/v) corn starch, 400g/l glass bead, 10,880 unit/l α -amylase, pH 4.4, 50°C, and 200 rpm.

10,880 unit/l로 고정하고 대신 exo형인 glucoamylase의 사용량을 각각 420에서 31,500 unit/l까지 증감시키면서 생성된 환원당농도 및 당조성의 변화를 관찰하였다. Fig.1에서와 같이 glucoamylase의 사용량이 증가됨에 따라 생전분의 당화도 점차 촉진되었다. 그러나 사용량이 10,500 unit/l를 초과할 때에는 당화촉진 효과가 별로 크지 않았는데, 이는 endo형인 α -amylase의 상대적 양이 제한되어 있어 glucoamylase가 작용할 수 있는 비환원성 말단기가 충분히 형성되지 않아 exo형 glucoamylase가 효과적으로 작용하지 못하기 때문인 것으로 생각된다.

Glucoamylase 사용량의 증감에 따른 생성당조성의 경시적 변화를 HPLC로 분석하여 Fig.2에 나타내었다. Fig.2(A)에서와 같이 glucoamylase의 첨가량이 상대적으로 낮을 경우에는 각종 oligosaccharides가 반응초기에 주로 생성되었고, 반응이 진행됨에 따라 점차적으로 glucose로 전환되었다. 반면 glucoamylase 사용량이 많을 경우에는(Fig.2(B-D)) oligosaccharides의 생성량이 적은 반면 반응초기부터 주로 glucose가 생성되었으며, 소량 생성된 oligosaccharides도 단시간내에 glucose로 전환되었다.

α -Amylase 사용량의 영향 : 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분분자를 random하게 잘단하여 비환원성말단기를 형성시키는 endo형인 α -amylase의 적정 사용량을 검토코자, exo형 glucoamylase 사용량은 2,625

unit/l로 고정하고 α -amylase의 양을 각각 5,440에서 65,280 unit/l까지 증감시켜 생성된 환원당 농도 및 생성당 조성의 변화를 경시적으로 비교한 결과는 각각 Fig.3과 4와 같다. Fig.3에서와 같이 α -amylase의 사용량이 증가됨에 따라 생전분당화가 크게 촉진되었다. 이로 미루어 endo형 α -amylase의 역할이 분쇄마찰매체 효소반응계를 활용한 생전분 효소당화에도 매우 중요함을 알 수 있었다.

생성당 조성의 변화는 Fig.4에서 보듯이 α -amylase의 사용량이 증가함에 따라 예상했던대로 반응초기에 다량의 oligosaccharides가 생성되었다. 그러나 α -amylase의 사용량이 상대적으로 낮을 경우에는 반응초기부터 glucose가 주로 얻어졌다. 고순도-고농도의 포도당용액을 필요로 하는 HFCS 제조공정에서는 glucose를 직접 생성하는 glucoamylase의 역할이 가장 중요하다고 할 수 있다. 그러나 분쇄마찰매체 효소반응계의 무증자당화의 효율성을 제고시키고 glucoamylase 사용량을 줄이기 위해서는 glucoamylase 단독 사용보다는 적절한 양의 α -amylase를 첨가하여 보완시켜 줌이 필요하다.

위의 결과를 종합하면, 분쇄마찰매체 효소반응계에서 옥수수 생전분을 기질로한 고순도 glucose 생산에 적합한 glucoamylase의 사용량은 10,500 unit/l 정도로 판단되며, glucoamylase와 α -amylase의 적정혼합비율은 약 1:1~1:2(unit) 범위로 판단된다.

분쇄마찰매체 효소반응계의 효용성 : Fig.5는 분쇄마찰매체 효소반응계의 효용성을 검토하기 위해서 생전분을 위와 같이 glucoamylase와 α -amylase가 1:1(unit)로 혼합된 효소로, 분쇄마찰매체 효소반응계에서 당화시킨 군과 분쇄마찰매체를 함유하지 않은 비교군의 환원당 비교군의 환원당 생성량을, 기존의 증자법으로 효소액화하여 당화시킨 군의 환원당 생성량과 비교하였다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서 8시간 무증자당화시켰을 경우 환원당 농도는 180g/l로서 비교군의 108g/l보다 매우 높은 반면 증자군의 220g/l보다는 다소 낮았다. 그러나 24시간 경과 후에는 237g/l의 환원당이 얻어졌으며, 이는 증자당화의 242g/l와 거의 유사한 수준으로 환원당 수율은 각각 96%와 98%로서 57%인 비교군보다 매우 높았다.

이러한 결과는 전보(8)에서 옥수수 생전분을 본 실험과 동일한 사용량의 정제된 exo형 glucoamylase만으로 분쇄마찰매체 효소반응계를 활용하여 24시간 당화하여 얻은 환원당 농도인 194g/l(78% 환원당수율) 그리고 endo형 α -amylase만으로 24시간 당화시켜 얻은 112g/l(45% 환원당수율)보다 현저히 증가된 결과로서

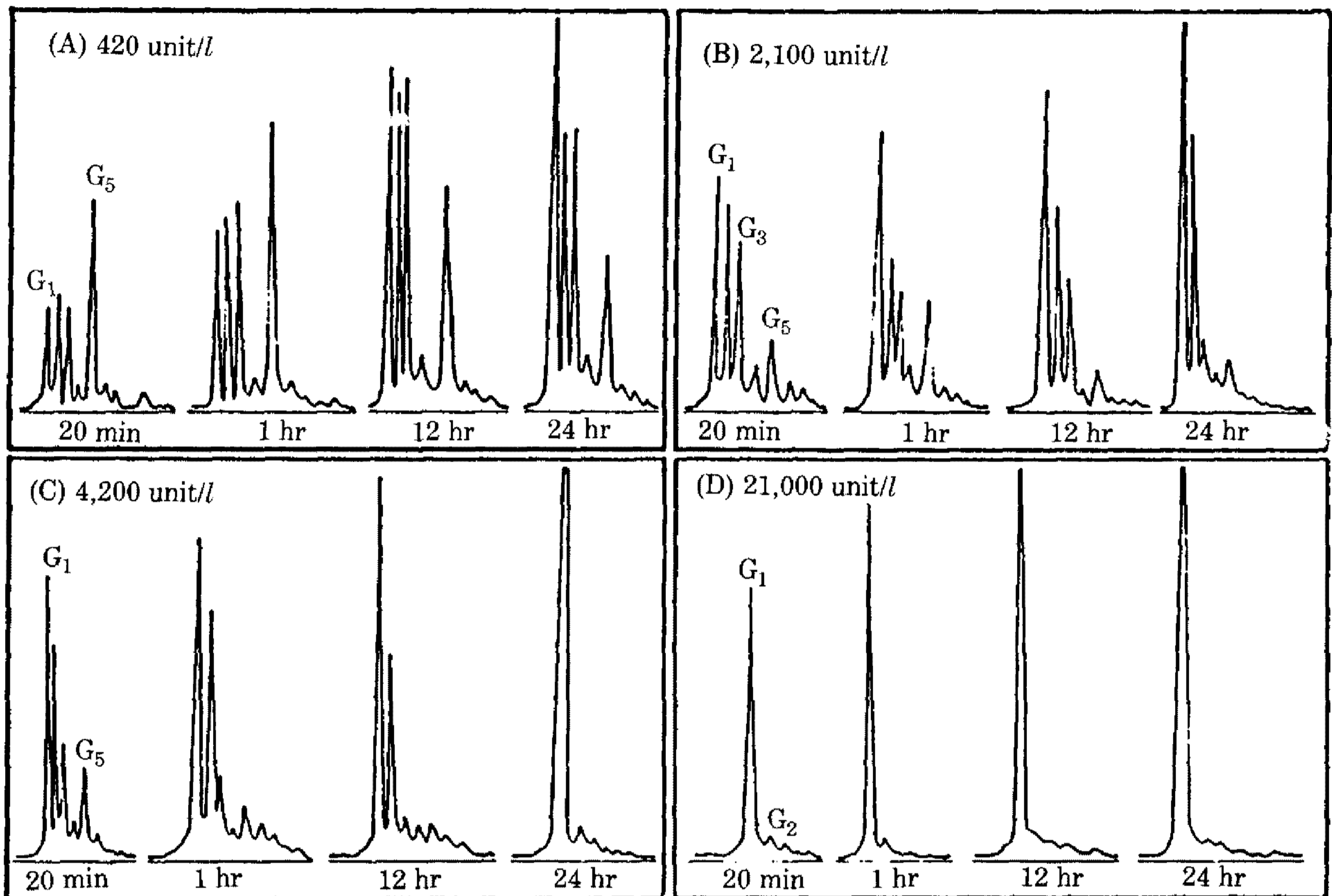


Fig. 2. Effect of glucoamylase dosage on the sugar profiles from the hydrolysis of raw corn starch by mixed glucoamylase and α -amylase in an agitated bead reaction system.

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

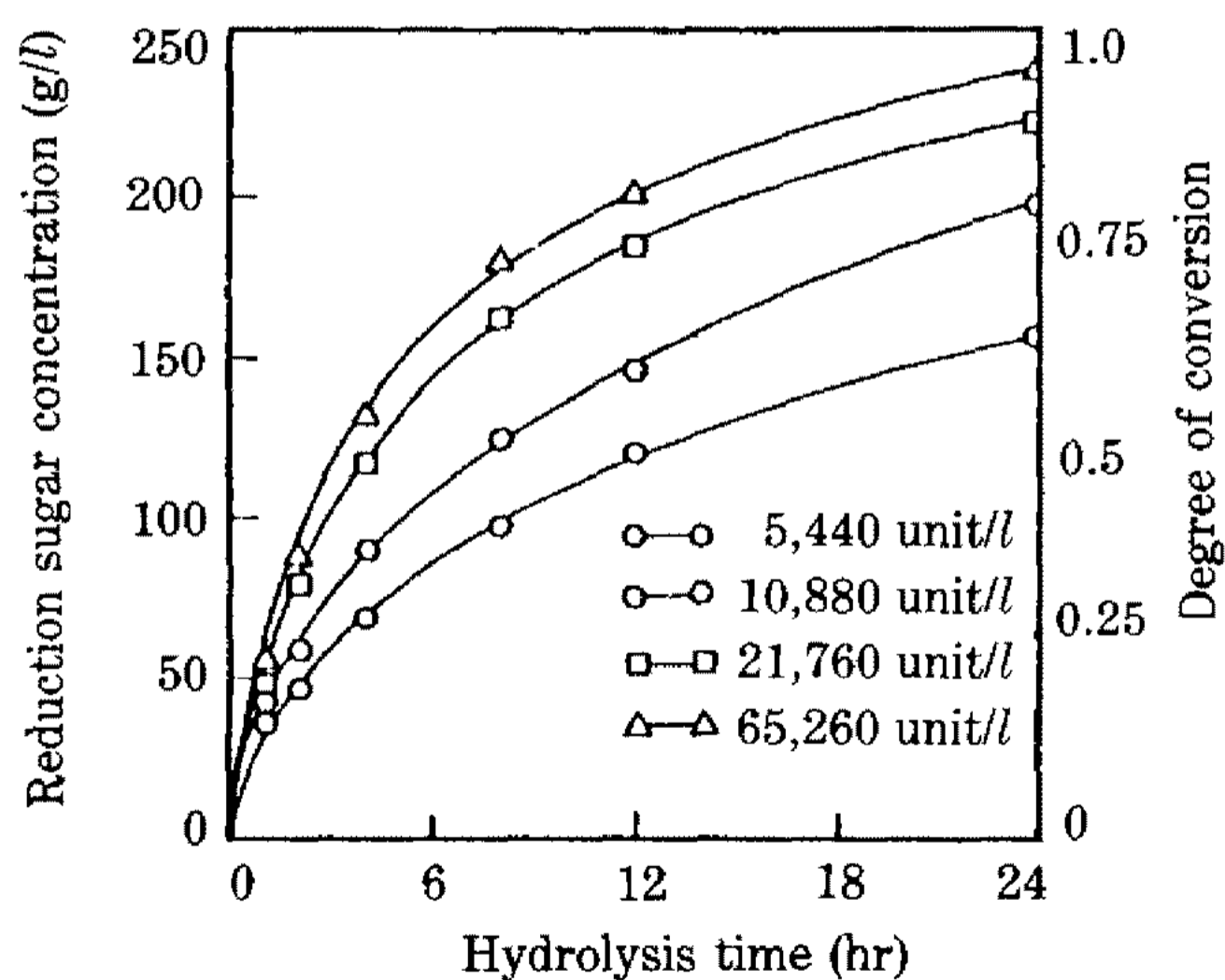


Fig. 3. Effect of α -amylase dosage on the progress of hydrolysis of raw corn starch by mixed glucoamylase and α -amylase in an agitated bead reaction system.

220g/l (w/v) corn starch, 400g/l glass bead, 2,625 unit/l glucoamylase, pH 4.4, 50°C, and 200 rpm.

혼합효소의 고농도 첨가의 영향: Glucoamylase와 α -amylase의 혼합비율을 1:1(unit)로 고정하고 상기 효소의 사용량을 각각 2,625에서 31,500 unit/l까지 증감시키면서 당화시킨 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 효소의 사용량이 증가됨에 따라 당화율이 점차적으로 증가하였으며, 특히 혼합효소를 31,500 unit/l와 같은 높은 수준으로 첨가하여 줌으로써 증자균과 유사한 수준의 생전분 무증자당화가 가능하였다.

위와 같이 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분의 무증자당화시 증자법과 유사한 수준의 당농도를 얻기 위해서는 다소 많은 양의 효소가 필요함을 알 수 있다, 이와 같은 결점을 극복하고 분쇄마찰매체 효소반응계를 활용한 무증자당화법의 효율성을 증대시키기 위해서는 생전분당화에 적합한 무증자 효소를 개발하여 효소사용량을 감소시키거나 또는 pectinase나 pullulanase와 같은 생전분당화에 보조적 역할을 하는 각종 효소들을 복합사용함이 필요하리라 예상되며 이에 대한 연구가 요망된다.

glucoamylase와 α -amylase의 상호보완작용의 중요성을 잘 나타내고 있다.

Scanning electron microscope에 의한 전분입자의 구조 관찰

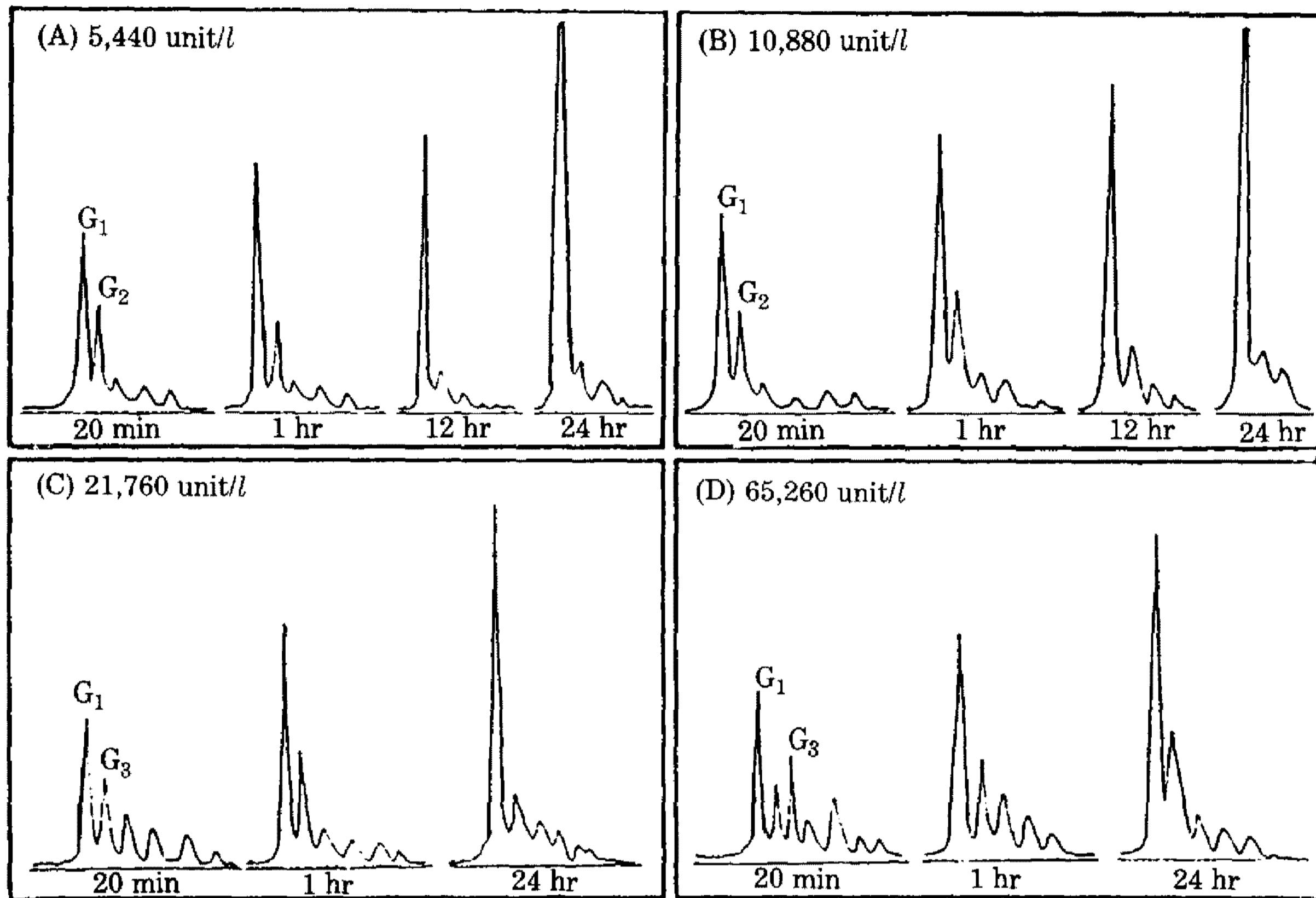


Fig. 4. Effect of α -amylase dosage on the sugar profiles from the hydrolysis of raw corn starch by mixed glucoamylase and α -amylase in an agitated bead reaction system.

220g/l (w/v) corn starch, 400g/l glass bead, 2,625 unit/l glucoamylase, pH 4.4, 50°C, and 200 rpm.

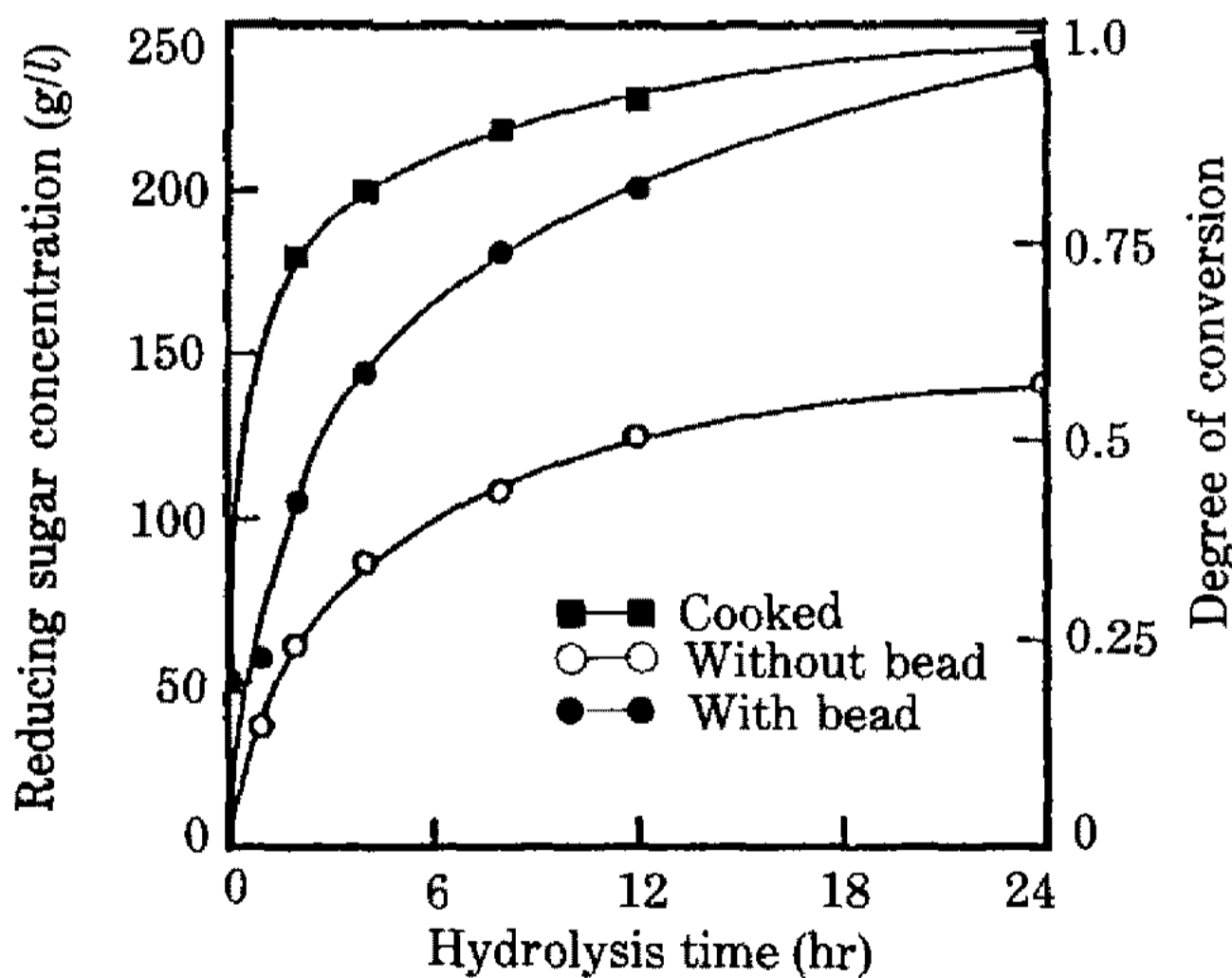


Fig. 5. The progress of hydrolysis of raw corn starch by mixed glucoamylase and α -amylase in reaction system without bead and in an agitated bead reaction system.

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

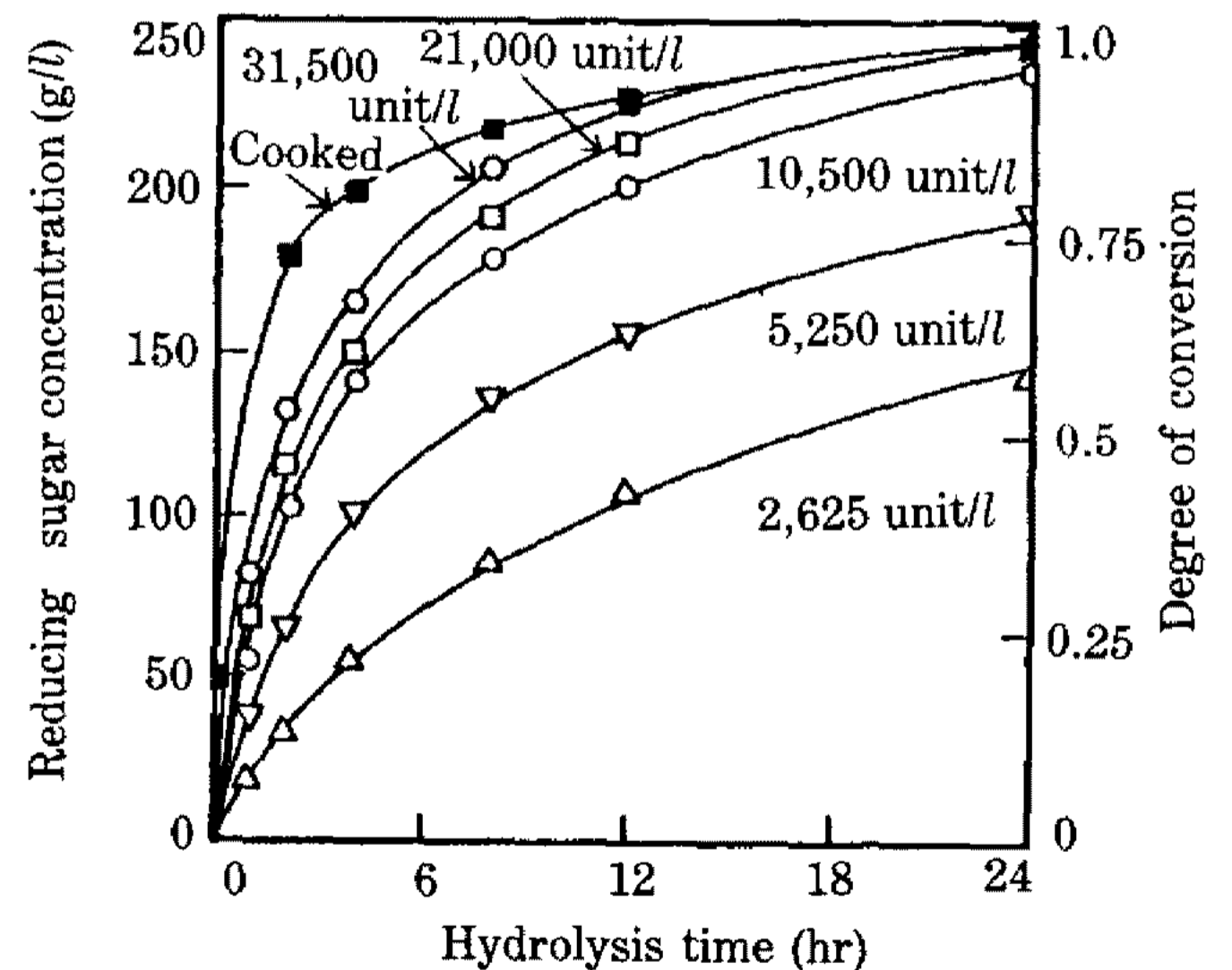


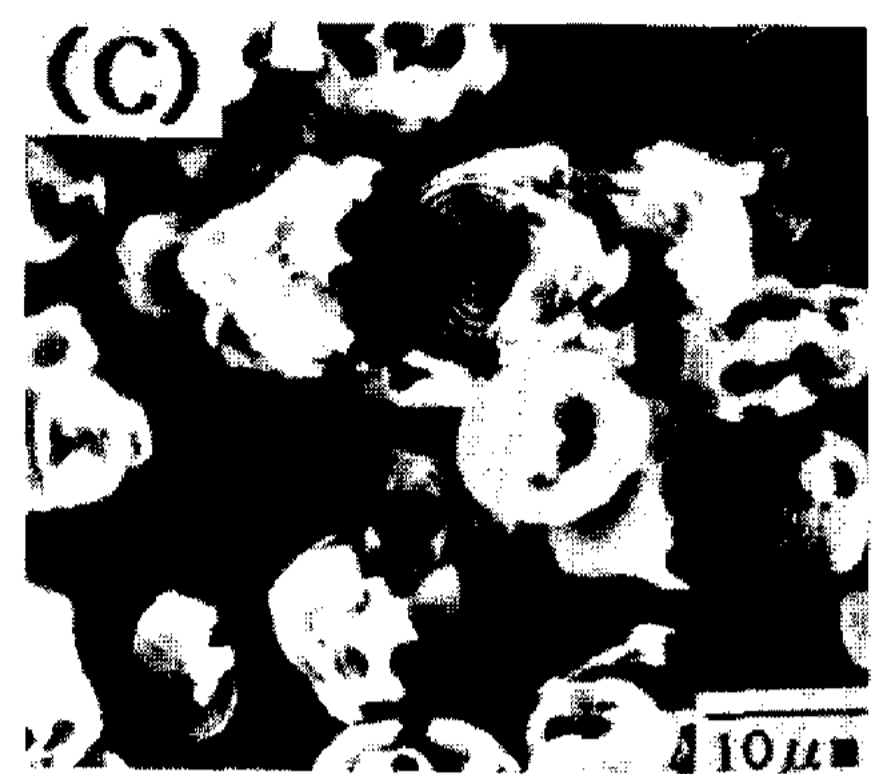
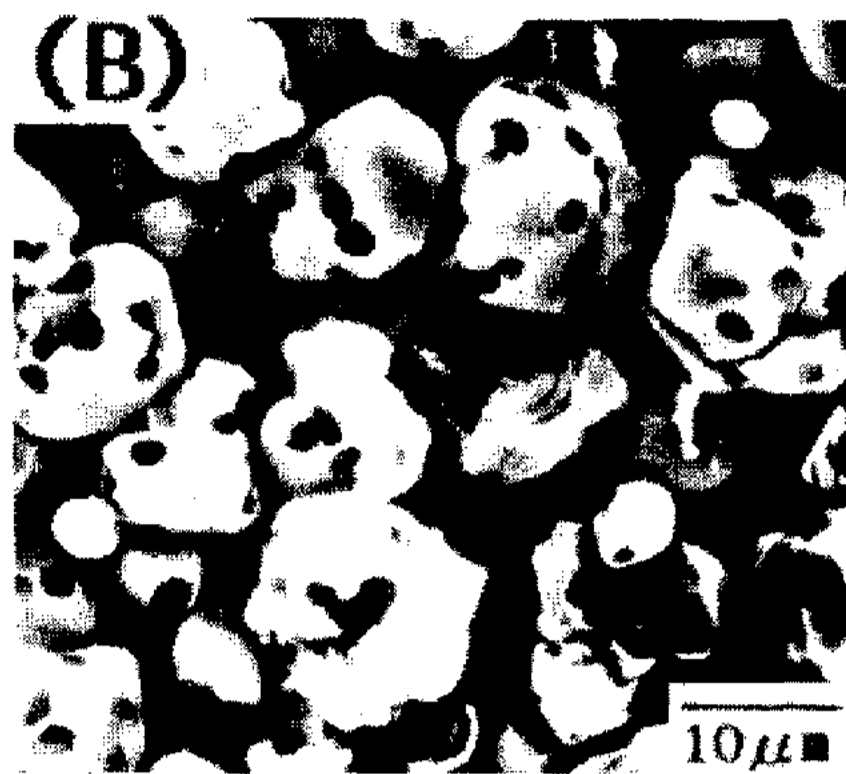
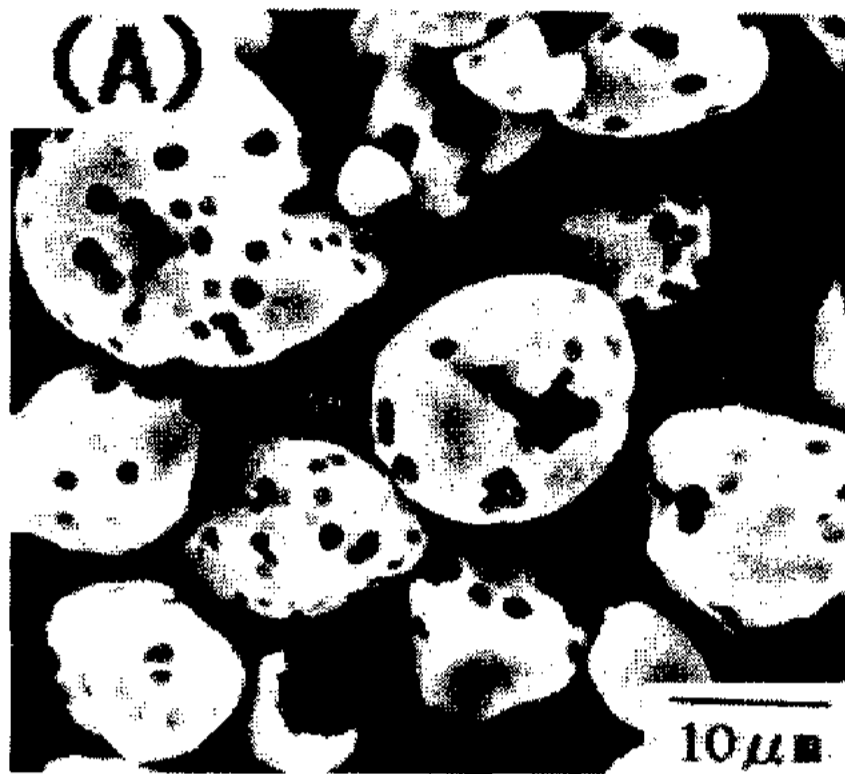
Fig. 6. Effect of enzyme dosage on the progress of hydrolysis of raw corn starch by mixed glucoamylase in an agitated bead reaction system.

220g/l (w/v) corn starch, 400g/l glass bead, glucoamylase: α -amylase = 1:1 (unit), pH 4.4, 50°C, and 200 rpm.

분쇄마찰매체 효소반응계에게 혼합효소로 각각 2, 4, 12 시간 당화시킨 옥수수 생전분입자의 구조변화를 관찰하여 무침가군과 Fig.7에 비교하였다. 분쇄마찰매체를

첨가하지 않은 생전분당화의 경우는 전분입자에 cavity가 형성되면서 효소작용이 진행되었다(Fig.7(A-C)). 이러한 현상은 전보(8)에서 exo형 glucoamylase 만으

Without bead



With bead

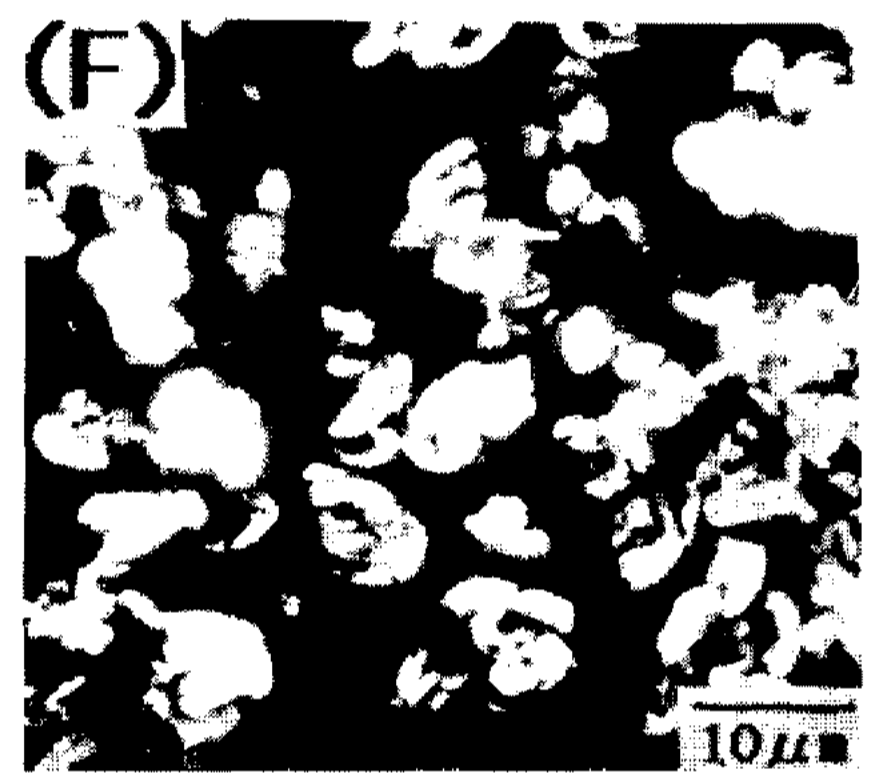


Fig. 7. Scanning electron microscopic photogram of granular structure of corn starch saccharified by mixed glucoamylase and α -amylase

(A) (B) (C) in reaction system without bead for 2 hr, 4 hr and 12 hr, (D) (E) (F) in an agitated bead reaction system for 2 hr, 4 hr and 12 hr, respectively.

로 당화하였을 때와 유사한 양상이며 침식 정도는 더욱 컸다.

한편, 분쇄마찰매체 효소반응계에서는 반응초기(Fig. 7 (D))에는 효소의 침식작용으로 입자에 cavity가 먼저 형성되었으며 단편화가 크게 진행되지는 않았고, 당화가 진행됨에 따라 효소의 침식작용에 의해 cavity가 확대되었고 큰 hole의 전분입자는 분쇄마찰매체의 기계적 충격으로 많은 작은 입자들로 급속히 단편화(fragmentation)되었다. 이와 같은 생전분입자의 붕괴양상은 전보(8)에서 보고한 바 있는 α -amylase를 단독으로 사용했던 경우보다는 glucoamylase만을 이용하였을 경우와 더 유사한 형태였다. 그러나 입자의 단편화 현상은 상기 효소의 단독 사용시보다 빠른 시간 이내에 그리고 신속히 진척되었으며 두 효소의 보완작용의 필요성을 잘 보여주고 있다.

Particle size distribution의 변화

Fig. 8은 분쇄마찰매체 효소반응계와 매체 무첨가군에

서 생전분의 효소당화 진척에 따른 잔류전분입자의 크기분포(particle size distribution)를 측정하여 비교한 결과이다. 효소작용을 받지 않은 옥수수 생전분입자의 median size는 Fig. 8(A)와 같이 $14.86\mu\text{m}$ 였고, 표준편차 4.96으로 분포되어 있었다. 상기 생전분을 효소첨가없이 원충용액에 젖은 상태로 24시간 동안 분쇄마찰시킨 후의(Fig. 8(B)) median size는 $15.36\mu\text{m}$ 로서 표준편차는 6.06였고, 처리하지 않은 옥수수 생전분보다 median size가 약간 증가되었고 표준편차 역시 증가하였다. 이와 같은 median size의 증가는 분쇄마찰매체의 기계적 충격에 의한 전분입자의 균열(crack)에 의한 체적증가 때문이라 유추된다. 이러한 결과는 분쇄마찰매체의 기계적 충격은 입자에 균열을 유발시킬 뿐 전분입자의 단편화를 진행시키지 않는다는 SEM을 이용한 전보(8)의 결론을 뒷받침하고 있다.

전분질의 효소당화 진척도가 유사한 수준인, 매체를 첨가하지 않은 비교군의 24시간 당화 후 잔류생전분(Fig. 8(C))과 분쇄마찰매체 효소반응계에서 4시간 당

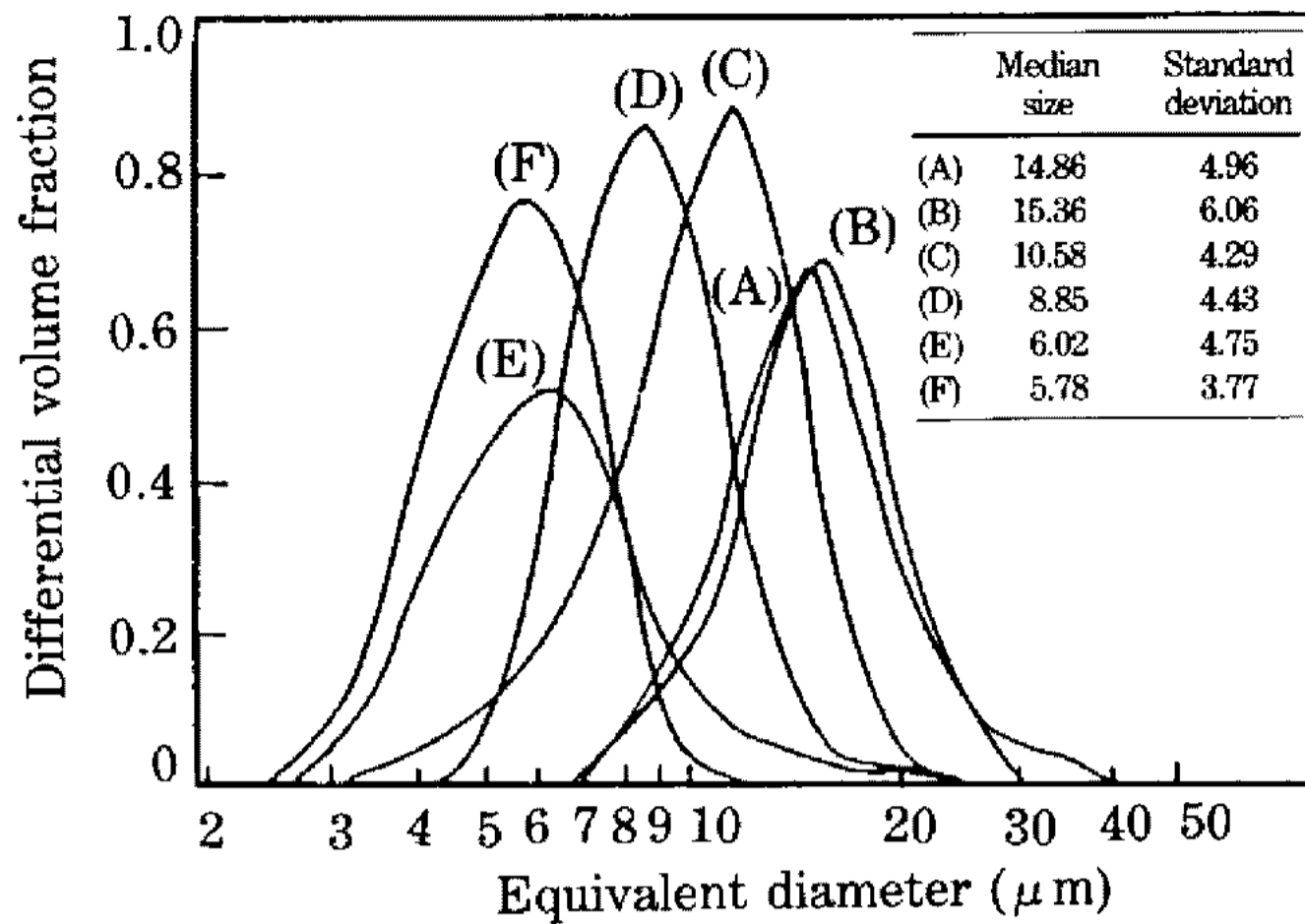


Fig. 8. Particle size distribution of corn starch granule. (A) raw corn starch, (B) wet milling for 24 hr, saccharified by mixed glucoamylase and α -amylase: (C) in reaction system without bead for 24 hr, (D) (E) (F) in an agitated bead reaction system for 4 hr, 8 hr, 24 hr, respectively.

화시킨 잔류생전분 (Fig. 8(D))의 particle size distribution을 비교하였다. 무첨가군의 median size는 24시간 당화 후 10.58 μm 로 효소당화가 진행됨에 따라 다소 감소한 반면, 분쇄마찰매체 효소반응계에서는 4시간 당화 후의 median size가 8.85 μm 로서 적어 짧은 시간내에 작은 입자로 신속히 단편화가 진행됨을 알 수 있었다. 한편, 분쇄마찰매체 효소반응계에서 24시간 당화시킨 잔류생전분입자의 median size는 5.78 μm 로서 (Fig. 8 (F)), 이는 초기 생전분입자 크기의 약 0.39배이며 이를 체적으로 환산하면 초기 생전분의 약 0.06배에 불과하여 많은 작은 입자로 단편화됨을 명확히 나타내고 있으며 이는 위에서 SEM으로 관찰한 결과의 정량적 해석을 가능하게하고 있다.

X-ray 회절양상의 변화

효소당화과정 중 전분입자의 미세결정구조 (microcrystalline structure)의 변화를 규명하기 위하여 잔류생전분을 경시적으로 채취하여 X-ray 회절양상을 관찰한 결과는 Fig. 9와 같다. 옥수수 생전분 (Fig. 9(A))은 2θ 값이 각각 15.17, 18.2 그리고 23.2°일 때 강한 peak를 나타내는 A형 전분이었다(4).

분쇄마찰매체 효소반응계에서는 Fig. 9(B-D)에서 관찰되듯이 당화 정도가 그리 크지 않는 4~8시간까지는 X-ray 회절양상이 크게 변하지 않아 생전분을 효소분해하면서 관찰한 Fukuba 등(16)의 결과와 유사하였으며, 이는 전보(7)에서 보고한 바 있는 분쇄마찰매체의 기계적 충격은 전분의 미세결정구조에 영향을 미치지 않는다는 결론을 뒷받침하고 있다. 반면 당화가 현저히 진행된

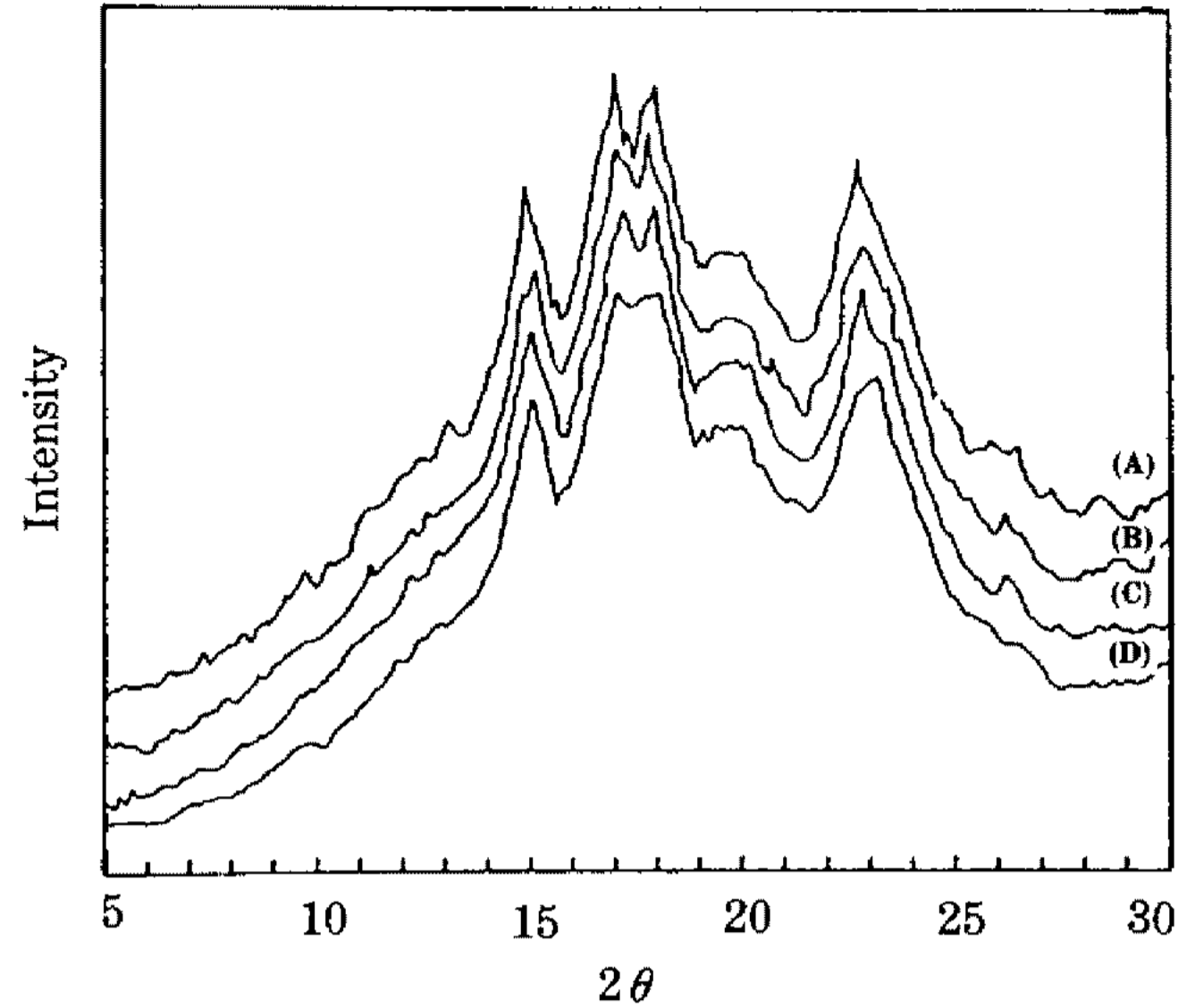


Fig. 9. X-ray patterns of corn starch granule. (A) raw corn starch, (B) (C) (D) saccharified by mixed glucoamylase and α -amylase in an agitated bead reaction system for 4 hr, 8 hr, and 24 hr, respectively.

24시간 후 (Fig. 9(D))에는 X-ray 회절양상에 약간의 변화가 있었다. 생전분의 산기수분해 및 효소분해시 X-ray 회절양상의 변화는 Colonna 등(4)이 관찰한 바 있으며 이들은 생전분의 비결정형 부분이 먼저 분해되기 때문이라고 하였다. 따라서 위와 같은 변화는 분쇄마찰매체에 의한 미세결정구조의 파괴보다는 전보(8)에서 관찰한 바 있는 amylose와 amylopectin의 효소에 대한 susceptibility의 차이에 의한 결정형 부분과 비결정형 부분의 조합비율의 변화에 기인하는 것으로 판단된다.

요 약

분쇄마찰매체 효소반응계에서 glucoamylase와 α -amylase의 보완작용에 의한 옥수수 생전분의 효소당화 mechanism을 규명코자, 분리·정제된 상기 효소의 혼합 비율에 따른 당화양상 및 생성당 조성, 전분입자 구조, 생전분입자의 particle size 분포, X-ray 회절양상의 변화 등을 관찰하였다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서도 효소를 분리하여 사용하였을 때보다 glucoamylase와 α -amylase를 혼합사용할 경우 당화율이 크게 향상되었으며, 고순도의 glucose 생산에 적합한 두 효소의 혼합 비율은 약 1:1~1:2(unit)로 판단된다. 생성당조성은 두 효소의 혼합비율에 따라 주로 결정되지만 증자법과는 달리 소량의 maltose를 포함한 각종 oligosaccharide가 반응초기에 소량 생성되었을 뿐 대부분 glucose로 직접 전환되었다. 분쇄마찰매체 효소반응계를 활용한 무증자

당화의 경우에도 증자당화와 유사한 수준의 당화속도를 얻기 위해서는 다량의 효소가 소요되었다. 잔류생전분입자의 구조적 변화를 SEM으로 관찰하여 양효소의 보완 작용에 의한 생전분입자의 단편화되는 현상을 규명하였으며, 분해과정 중의 생전분입자의 particle size distribution을 측정함으로써 SEM 관찰 결과를 정량화하였다. 또한 효소당화 후 잔류전분의 X-ray 회절양상의 변화를 관찰하였으며 이는 분쇄마찰매체에 의한 미세결정 구조의 파괴보다는 amylose와 amylopectin의 효소에 대한 susceptibility의 차이에 의한 결정형 부분과 비결정형 부분의 조합비율의 변화에 기인하는 것으로 판단되었다.

감사의 말

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

참고문헌

1. Whistler, R.L., J.N. Bemiller and E.F. Paschall: *Starch-Chemistry and Technology*, Academic Press Inc., p.87 (1984).
2. Sugimoto, K. and M. Hirao: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **21**, 314 (1974).
3. Ueda, S.: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **22**, 114 (1975).
4. Colonna, P., A. Buleon and F. Lemarie: *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 895 (1988).
5. 이용현, 조구형 : 산업미생물학회지, **14**, 29 (1986).
6. 이용현, 조구형 : 산업미생물학회지, **14**, 399 (1986).
7. 조구형, 이용현 : 산업미생물학회지, **14**, 407 (1986).
8. 박동찬, 이용현 : 산업미생물학회지, **18**, 260 (1990).
9. Van Beynum, G.M.A. and J.A. Roels: *Starch Conversion Technology*, Marcel Dekker Inc., New York, p.101, 1985.
10. Sigma Co.: *Sigma Catalog*, 176 (1990).
11. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
12. Sigma Co.: *Sigma Diagnostics Glucose Procedure*, No.510, Sigma (1990).
13. Fujii, M., S. Murakami, Y. Yamada, T. Ona and T. Nakamura: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1393 (1981).
14. Fujii, M. and Y. Kawamura: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 260 (1985).
15. Fujii, M., T. Homma and M. Taniguchi: *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 910 (1988).
16. Fukuba, H. and H. Morhri: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **23**, 26 (1976).

(Received April 26, 1990)