

## Extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 Cyclodextrin 효소합성

이용현\* · 박동찬

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

## Enzymatic Synthesis of Cyclodextrin in an Heterogeneous Enzyme Reaction System Containing Insoluble Extruded Starch

Lee, Yong-Hyun\* and Dong-Chan Park

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

**Abstract** – Direct synthesis of cyclodextrin (CD) from extruded insoluble corn starch without liquefaction procedure using cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) was carried out. Increased CD production rate and yield were achieved in heterogeneous enzyme reaction system containing extruded corn starch compared with those of conventional system employing liquefied or partially cyclized starch. At extruded starch concentration of 100 g/l the CD concentration and conversion yield were reached up to 54 g/l and 0.54, respectively. High purity of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CDs without accumulation of undesirable malto-oligosaccharides was produced, furthermore, the residual extruded starch was easily separated by centrifugation from reaction mixture, which will facilitate the purification procedure. Granular structure of extruded starch was observed by SEM to investigate enzyme reaction mechanism. Supplemental addition of  $\alpha$ -amylase enhanced slightly the initial CD production rate, but it decomposed produced CD at the late stage. Various extruded raw starches, such as, corn, rice, and barley were also suitable substrates for CD production.

6-12개의 glucose 분자가  $\alpha$ -1,4-glucoside로 환상결합된 비환원성 malto-oligo당인 cyclodextrin은 분자구조에서 유래하는 독특한 포접성으로 식품, 의약품, 화장품, 그리고 농약 분야 등에서 각종 물성의 개선 및 안정성 유지를 목적으로 광범위하게 응용되고 있다(1-3). 현재 cyclodextrin 생산에는 전분 또는 전분질원료를 액화형 amylase로 증자액화하여 DE 10-20 정도로 가용화시킨 전분, 또는 CGTase로 부분환화시킨 가용성 전분에 CGTase를 첨가하여 cyclodextrin을 합성하는 수용성 액화전분-CGTase로 구성되는 균일상 효소반응계가 주로 활용되고 있다(4). 그러나

위와 같은 CD제조공정은 낮은 수율, CGTase의 다량소모, 그리고 분리정제과정의 복잡성 등 단점이 있어 개선이 필요하다(5, 6).

본 연구실에서는 CD생산에 관한 일련의 연구를 수행해 오고 있으며(7-10), 특히 전보(11)에서는 생전분을 기질로 액화과정을 경유하지 않고 직접 CD를 합성하는 연구를 수행하였으며, 수반되는 낮은 효소반응속도, 농도, 그리고 수율의 제한성을 극복하기 위하여, 불용성 생전분-CGTase로 구성되는 불균일상 효소반응계에 분쇄마찰매체를 첨가하여 CD생성 효소반응을 촉진시키는 새로운 CD합성법을 보고한 바 있다. 이와 같은 분쇄마찰매체함유 효소반응계를 이용하면 CD 합성속도와 수율이 현저히 증가될 뿐만 아니라, 각종 oligo당의 함량이 적은 고순도의 cyclodextrin이 얻어지며, 미이용 생전분은 쉽게 분리 제

**Key words:** Cyclodextrin, cyclodextrin glucanotransferase, extruded starch, heterogeneous enzyme reaction system

\*Corresponding author

거되므로 CD의 분리정제가 용이하며, 또한 glucoamylase와  $\alpha$ -amylase와 같이(12) CGTase도 생전분에 흡착 회수 재사용할 수 있으리라 예상되는 등, 많은 장점이 있음을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 생전분을 extrusion시켜 입자의 구조를 변형시킨 불용성전분과 수용성 CGTase로 구성되는 불균일상 효소반응계에서의 CD 효소합성법에 관한 연구를 수행하였다. Extrusion된 전분(질) 입자는 팽윤  $\alpha$ 화된 전분 구조를 갖고 있어(13), CGTase의 작용을 쉽게 받을 수 있게 되며 또한 대부분이 원심분리할 수 있는 불용성상태로 존재하므로 위에서와 같은 불용성기질을 이용할 때 얻을 수 있는 이점들이 예상된다. 또한 extrusion은 전분(질)의 가공 등에 많이 활용되는 에너지 효율면, 경제성 면에서 장점이 많은 전분 전처리 기술이다(14, 15). 본 연구에서는 최적 효소반응 조건을 확립하고 또한 생성물의 조성을 분석하여 extrusion시킨 전분을 활용한 새로운 CD 생산공정의 효용성을 검토하였다. 뿐만 아니라 CGTase의 작용 mechanism을 전분입자 구조적 측면에서 규명하였고, 전분질을 직접 이용하는 가능성을 검토하는 등 새로운 고효율 CD 합성공정의 가능성을 모색하기 위한 기초적인 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용효소

사용효소는 *Bacillus macerans* 유래의 산업용 CGTase(Amano Co., 280 units/mg of protein)로써, 최적 pH는 6.0, 최적온도는 50°C였다. CGTase의 활성은 5% (w/v) 가용성 전분용액(pH 6.0) 5.0 ml에 CGTase 용액 0.1 ml를 첨가하여 50°C에서 1시간 반응시킨 후 생성된 cyclodextrin량을 측정하였으며, 이때 시간당 1 mg의 CD를 생성시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. 5%(w/v) 가용성 전분을 기질로 50°C, pH 6.0에서 24시간 반응 후 생성된  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD의 생성비율은 1.9 : 2.6 : 1.0이었다.

### 전분의 Extrusion 처리

옥수수전분을 수분함량 15%로 평형화시킨 후 single screw extruder에서 원료의 사입속도 300 g/min, screw 회전속도를 300 rpm으로 유지하면서 extru-

sion시켜, 건조한 후 분말화하였다. Extrusion시킨 옥수수전분은 수분함량이 8%였고 호화도는 65%였다. 경우에 따라 extrusion시킨 옥수수전분질(수분함량 5%), 쌀전분질(수분함량 8%), 보리전분질(수분함량 8%), 그리고 밀전분질(수분함량 5%)도 사용하였으며, 호화도는 각각 54, 56, 61, 그리고 47%였다.

### 호화도 측정

Wootton 등(16)의 방법에 따라 분말시료를 20 g/l로 현탁하여 3,000×g로 10분간 약하게 원심분리한 상등액을 100배 희석한 후, Iodine 용액(4% KI, 1% I<sub>2</sub>)을 1%(v/v) 첨가하여 600 nm에서 흡광도(A)를 측정하였다. 비교를 위하여 완전 호화된 시료를 0.5 M KOH 용액에 20 g/l가 되게 현탁하고 5분간 방치하여 완전히 호화시킨 후, 원심분리한 상등액을 중화하여 위와 같은 조건으로 흡광도(A<sub>0</sub>)를 측정하여 호화도(%, A/A<sub>0</sub>×100)를 계산하였다.

### Cyclodextrin 생산을 위한 효소반응

Extrusion시킨 전분(질) 100 g/l를 10 mM Maleic acid-NaOH 완충용액(pH 6.0)에 현탁하고 CGTase 6.0 ml/l(900 units/l)을 첨가하여 55°C에서 200 rpm으로 교반하면서 반응시켰으며, 경우에 따라 상기 조건을 변화시켰다.

보조효소 첨가의 영향을 살펴보기 위하여 상기 반응액에 *Bacillus licheniformis* 유래의 액화형 endo-type  $\alpha$ -amylase(Sigma Co.)를 각각 54, 270, 540 units/l 첨가하여 위와 같은 조건에서 반응시켰다.

또한 증자법을 이용한 cyclodextrin 생산은 전분기질 100 g/l(w/v)에 *Bacillus licheniformis* 유래의 액화형  $\alpha$ -amylase(Sigma Co.) 2,200 units/l를 첨가하여 90°C에서 20분간 가열하여 DE 10 전후로(6) 증자액화하고, 50°C로 냉각한 후 위와 같은 양의 CGTase를 첨가한 후 같은 조건에서 반응시켰다.

### 분석법

Cyclodextrin의 정량분석은 high performance liquid chromatography(HPLC Model-305, Gilson Co.)를 사용하였고, column은 carbohydrate analysis column(Waters co.), 용출용매는 acetonitril과 H<sub>2</sub>O(65 : 35)의 혼합용액, 용출속도는 1.0 ml/min이었고, RI

detector로 검정하였다.

### 전분입자의 미세구조 변화 관찰

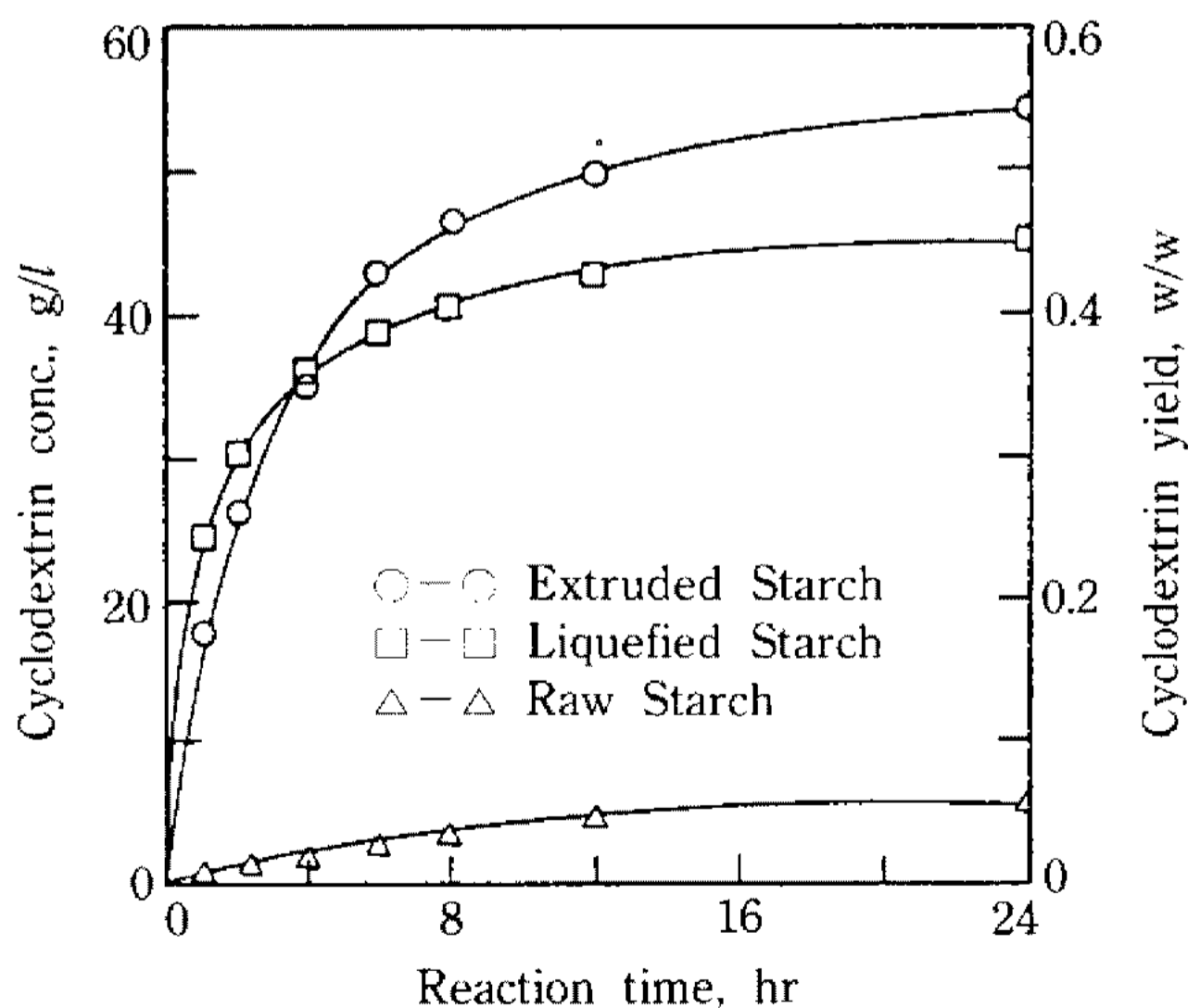
Extrusion시킨 전분입자를 ion coater(IB-5, Eiko Co.)로 백금으로 coating한 후, scanning electron microscope(SEM, ISI-SS 130, Asahi Co.)로 구조를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### Extrusion시킨 전분을 이용한 불균일상 효소반응계에서의 Cyclodextrin 생산

Fig. 1은 extrusion시켜 구조변형된 옥수수전분과 구조변형되지 않은 생전분, 그리고  $\alpha$ -amylase로 증자액화한 전분을 이용하여 동일한 효소반응 조건에서 CGTase를 반응시킬 경우의 합성된 cyclodextrin의 농도변화를 경시적으로 비교한 결과이다. Extrusion시킨 기질을 사용하였을 경우 24시간 반응 후에 54 g/l의 CD( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD)가 얻어졌고, 액화전분을 기질로 사용하였을 경우 얻어진 45 g/l보다 현저히 증가된 농도와 수율을 얻을 수 있었다. 반면 옥수수생전분을 직접 기질로 한 경우는 단지 6.0 g of CD/l가 생성되었다.

CD의 효소합성속도는 extrusion시킨 전분의 경우가 가용성 액화전분을 기질로 사용한 경우에 비하여



**Fig. 1.** Comparison of cyclodextrin produced from raw, extruded, and liquefied corn starches.

100 g/l (w/v) of corn starch, 900 units of CGTase/l, 200 rpm, pH 6.0, and 50°C.

반응초기 4시간까지는 약간 느렸으나 꾸준히 증가하여 높은 반응속도를 유지하였다. 이와 같은 높은 효소반응속도와 수율은 전분입자가 extrusion에 의하여 팽윤되고 또한  $\alpha$ -전분화됨으로써 반응액 중에 colloid 상태로 분산되므로 CGTase가 작용할 수 있는 가용 표면적이 현저히 증가되기 때문이다.

Fig. 2는 증자액화 전분을 사용한 균과 extrusion시킨 전분을 이용한 균의 12시간 효소 반응액의 CD와 당조성을 HPLC로 분석한 결과이다. 증자액화전분을 사용한 균일상 효소반응계에서는 CD 이외 glucose, maltose 및 기타 malto-oligo당이 다량 생성되었다. 반면 extrusion시킨 전분을 사용한 불균일상 효소반응계로는 주로  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD가 고순도로 생성되었고, malto-oligo당의 축적은 매우 적었다.

액화전분을 기질로 사용할 경우 생성된 각종 malto-oligo당은 전분을 액화하는 과정에서 생성되었거나, 또는 CGTase의 합성반응 과정 중 남은 잔기이거나 CGTase의 작용을 받지 않는 일부 oligo당 등으로 추측된다. 반면 extrusion 전분을 이용한 균의 malto-oligo당이 축적이 적은 것은 extrusion 과정에서 malto-oligo당이 생성되지 않고 또한 CGTase 반응이 팽윤 분산되어 노출된 전분의 비환원성 말단으로부터 점차적으로 진행되어  $\alpha$ -1,6-glycosidic 결합의 분지점에서 종결됨으로 미반응 잔기의 형성이 억제되기 때문인 것으로 유추된다.

뿐만 아니라 미반응 불용성 전분도 원심분리로 대부분 쉽게 분리 회수되어 재사용할 수 있었으며, 또한 사용 CGTase도 잔류전분에 흡착 회수하여 재활용이 가능한 등 많은 장점이 있는 새로운 고효율 CD 합성법으로 판단된다.

### Extrusion시킨 구조변형된 전분으로부터 Cyclodextrin 생산조건 검토

**기질농도 :** Fig. 3은 기질농도의 변화에 따른 CD생성량과 수율의 변화를 나타낸 것이다. 전분기질의 농도가 증가함에 따라 CD생성량( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD)은 증가하였으며, 24시간 반응 후 최대 생성량인 58 g/l는 기질농도 150 g/l에서 얻어졌으며, 그 이상의 기질농도에서는 오히려 감소하였다. 이는 고농도 첨가의 경우 수분이 extrusion된 전분입자내에 다량 흡수됨으로 유동성 수분의 양이 감소하고 또한 현탁액의 점도가 증가되어, 기질과 효소간의 접촉이 원활치

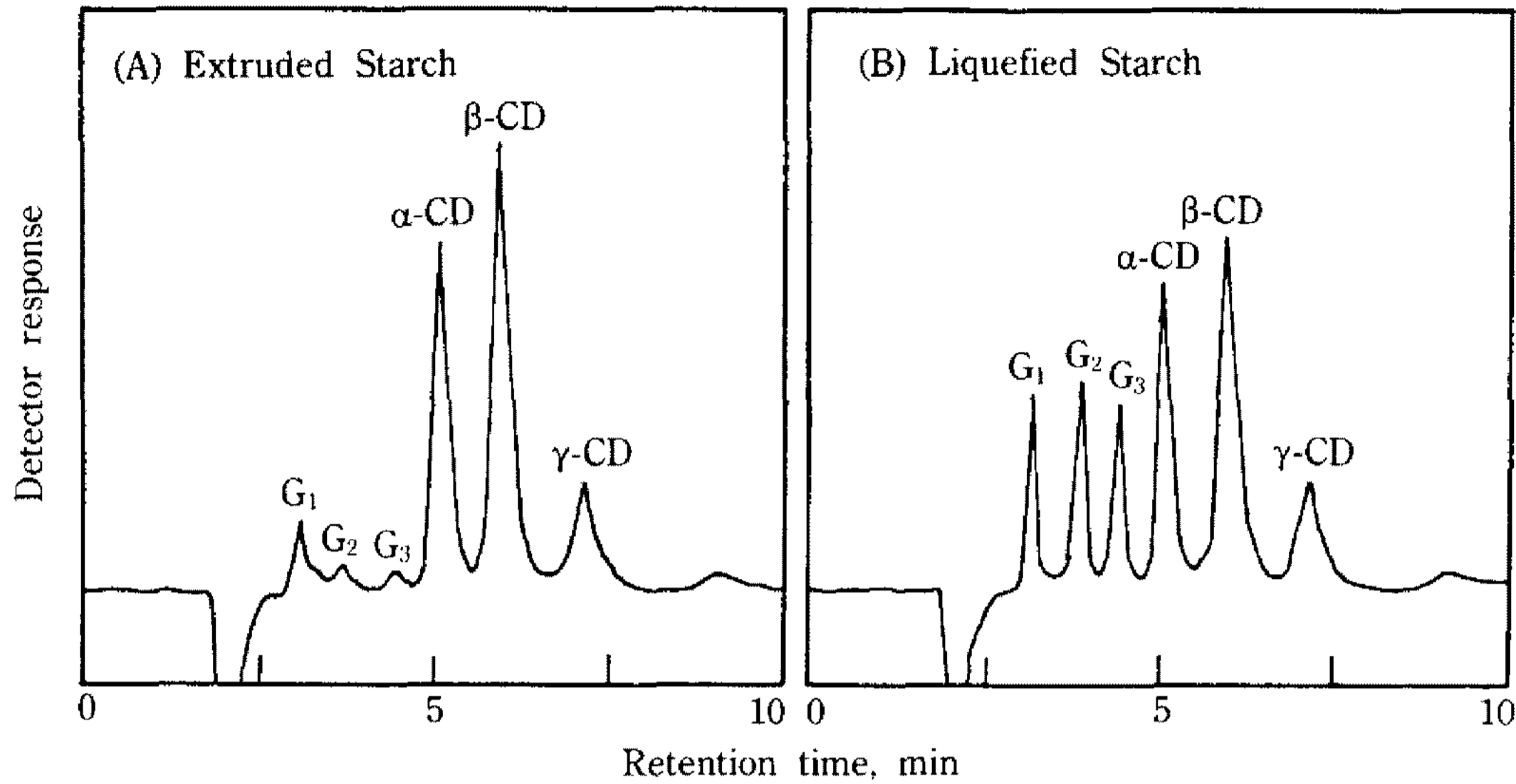


Fig. 2. Comparison of HPLC chromatogram of cyclodextrin and sugars produced from extruded and liquefied corn starch after 12 hours.

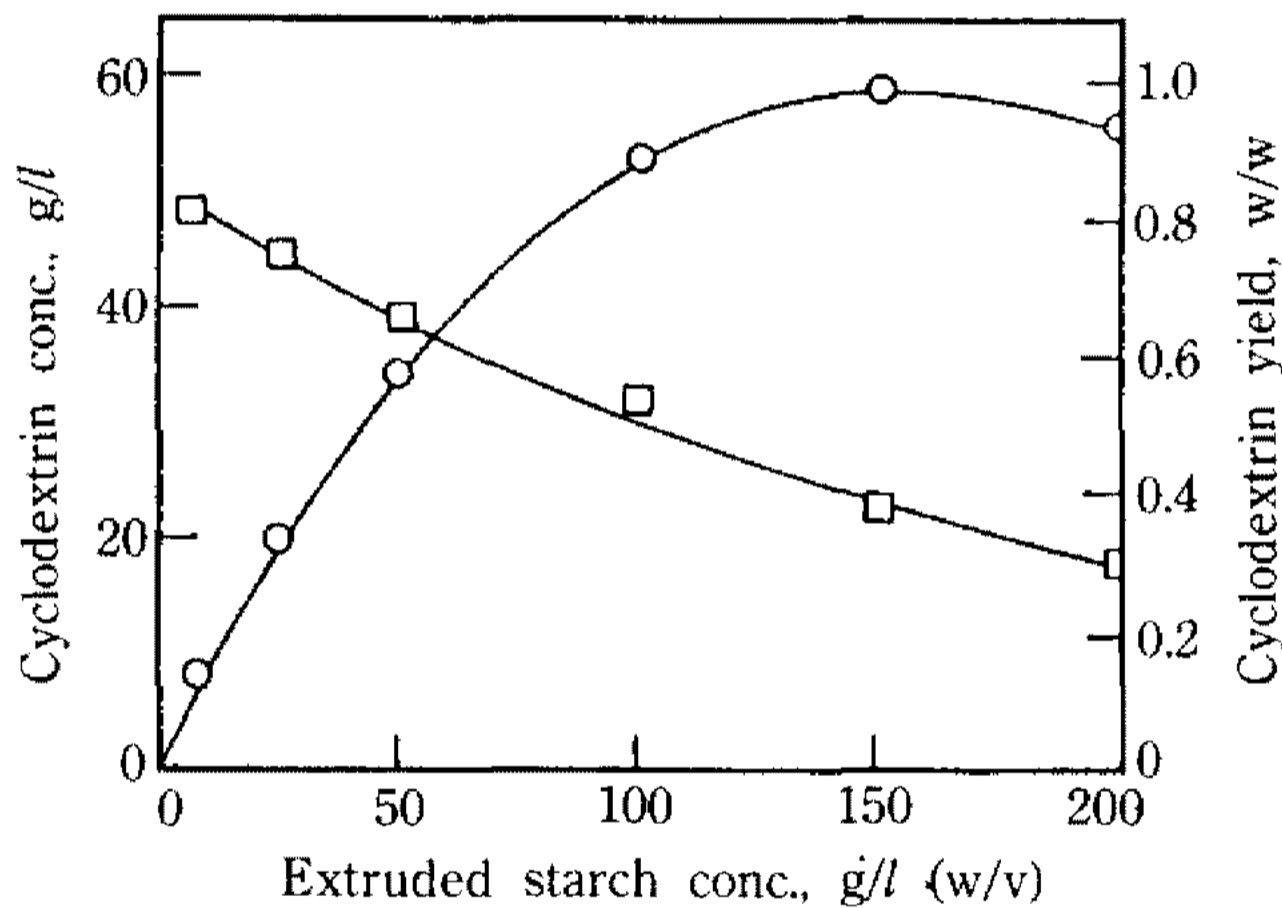


Fig. 3. Amount and yield of cyclodextrin produced according to substrate concentration after 24 hours. 900 units of CGTase/l, 200 rpm, pH 6.0, and 50°C (○; the amounts of CD, □; CD yield).

못하기 때문인 것으로 유추된다. 한편 CD 생성수율은 전분농도에 반비례하여 전분농도 10 g/l일 때 0.8로부터 150 g/l일 때 0.38로 감소하였다.

**CGTase 적정사용량** : 효소의 적정사용량인 기질에 대한 효소첨가량의 비율( $E_0/S_0$ , units/g substrate)을 검토하고자 전분의 농도를 50, 100, 150, 그리고 200 g/l으로 고정하고 CGTase 첨가량을 조절하여 24시간 반응 후 생성된 CD량을 측정하여 Table 1과 같다.

일반적으로 효소첨가량의 비율( $E_0/S_0$ )이 6.0일 때까지 효소 사용량이 증가할수록 CD 생성이 증가되었으나, 그 이상인 6.0~15.0 사이에서는 큰 변동이 없었다. 이는 전분기질 중의 효소가 작용할 수 있는

Table 1. Effect of the amount of CGTase and concentration of extruded corn starch on the cyclodextrin production

Amount of CGTase ( $E_0$ , units/l)	Conc. of extruded corn starch ( $S_0$ , g/l)			
	50	100	150	200
300	29.8	42.3	46.8	39.4
600	32.6	49.6	57.6	43.2
900	34.2	54.2	58.2	56.5
1200	34.5	54.9	58.4	55.8
1500	33.4	55.4	58.1	54.9

The reaction was carried out at the condition of pH 6.0, 200 rpm, and 50°C.

The amount of CD ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD) after 24 hr (g/l).

비환원성말단의 양이 일정한 범위로 고정되어 있기 때문으로 유추된다. 반면 15.0 이상에서는 오히려 약간 감소하였는데, 이는 전보(11)에서 관찰한 바와 매우 유사한 결과로서 과잉으로 투입된 여분의 CGTase가 coupling 또는 hydrolysis reaction과 같은 side reaction(17)을 일으켜 수율을 감소시키기 때문이라 사료된다. CD 합성에 적합한 적정 효소 첨가량 비율( $E_0/S_0$ )은 6.0~15.0 범위로 판단된다.

**Extrusion시킨 전분입자의 효소반응 중의 미세구조 변화**

Fig. 4는 extrusion시킨 전분입자를 CGTase로 효소반응시키면서 입자구조의 변화를 관찰한 결과이다. Extrusion시킨 전분입자(Fig. 4(B))는 처리하지 않은

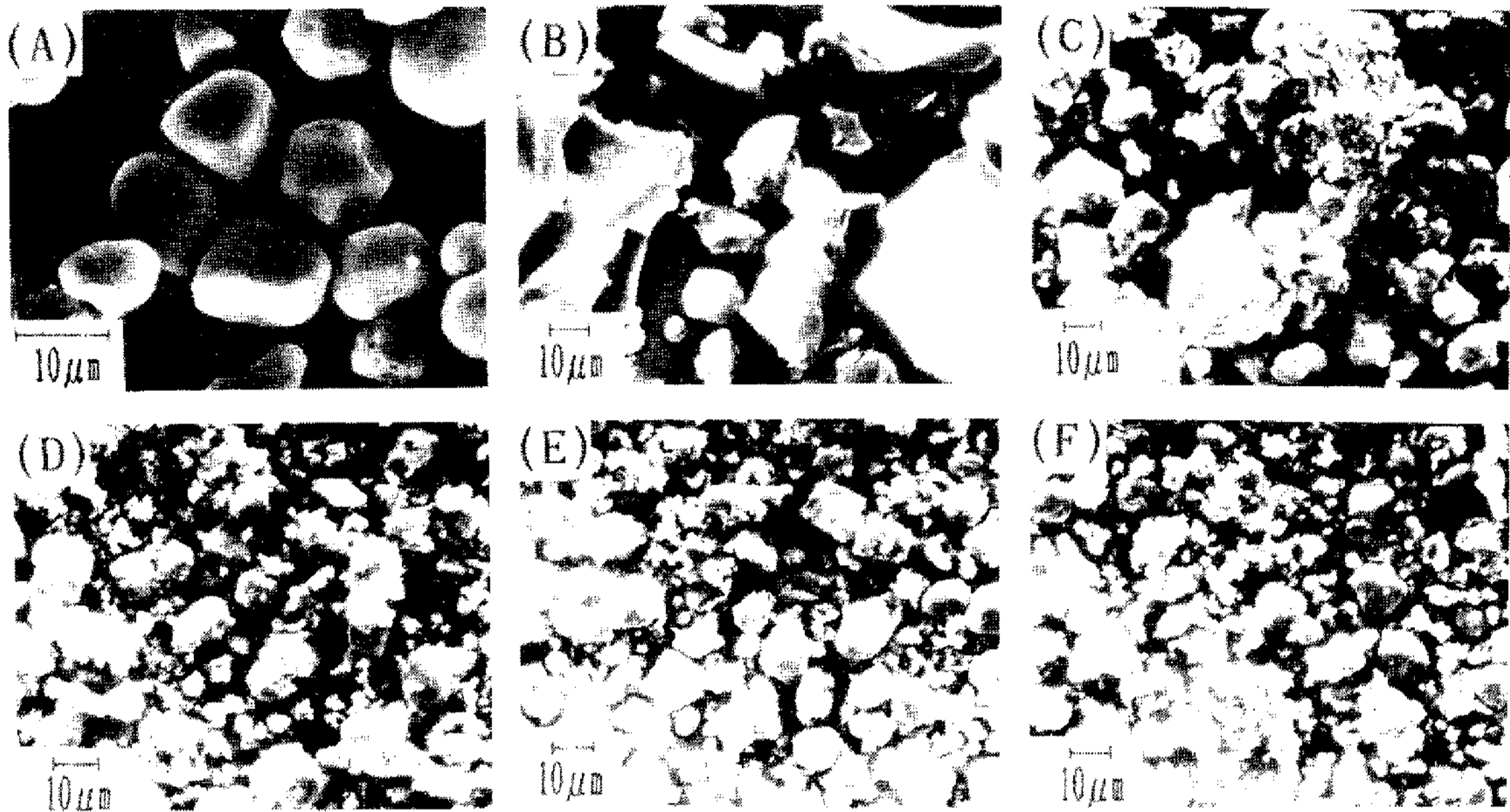


Fig. 4. Scanning electron microscopic photogram of granular structure of raw corn starch (A), extruded corn starch (B) and subjected to the CGTase action after 2, 8, 12, and 24 hours (C-F).

생전분자에 비하여 처리과정 중 지름과 표면적이 각각 약 3~5, 9~25배 증가하여 크게 팽윤되었고, 구조가 변형되지 않은 비팽윤 전분도 다량 함유되어 있었다.

Extrusion시킨 팽윤된 전분은 CGTase의 효소작용으로 반응초기 입자에 심한 균열이 생성되었고, 반응이 진행됨에 따라 많은 작은 입자로 단편화되는 양상을 나타내었다(Fig. 4(C-F)). 특히 반응이 거의 종료되는 8시간 후에는 팽윤된 입자는 작은 단편화된 전분입자로 관찰되었고, 구조변형되지 않은 전분입자는 대부분 약간의 cavity가 형성되었을 뿐 그대로 남아 있어, 팽윤 전분이 주로 CD합성에 이용됨을 알 수 있다.

전보(11)에서는 분쇄마찰매체함유 효소반응계를 이용한 CD 효소합성의 경우 효소의 침식작용과 고형매체의 물리적 충격의 상호보완작용으로 전분입자가 많은 작은 입자로 단편화되므로서 효소반응이 촉진됨을 보고한 바 있다. 그러나 extrusion시킨 팽윤 전분을 기질로 사용할 경우 CGTase의 작용 양상은 처리되지 않은 생전분 혹은 분쇄마찰매체함유 효소반응계에서와는 상이한 독특한 양상으로 효소반응이 촉진됨을 알 수 있었다.

미반응 잔류전분의 호화도 변화

Fig. 5는 CGTase 효소반응 중의 원심분리 가능한

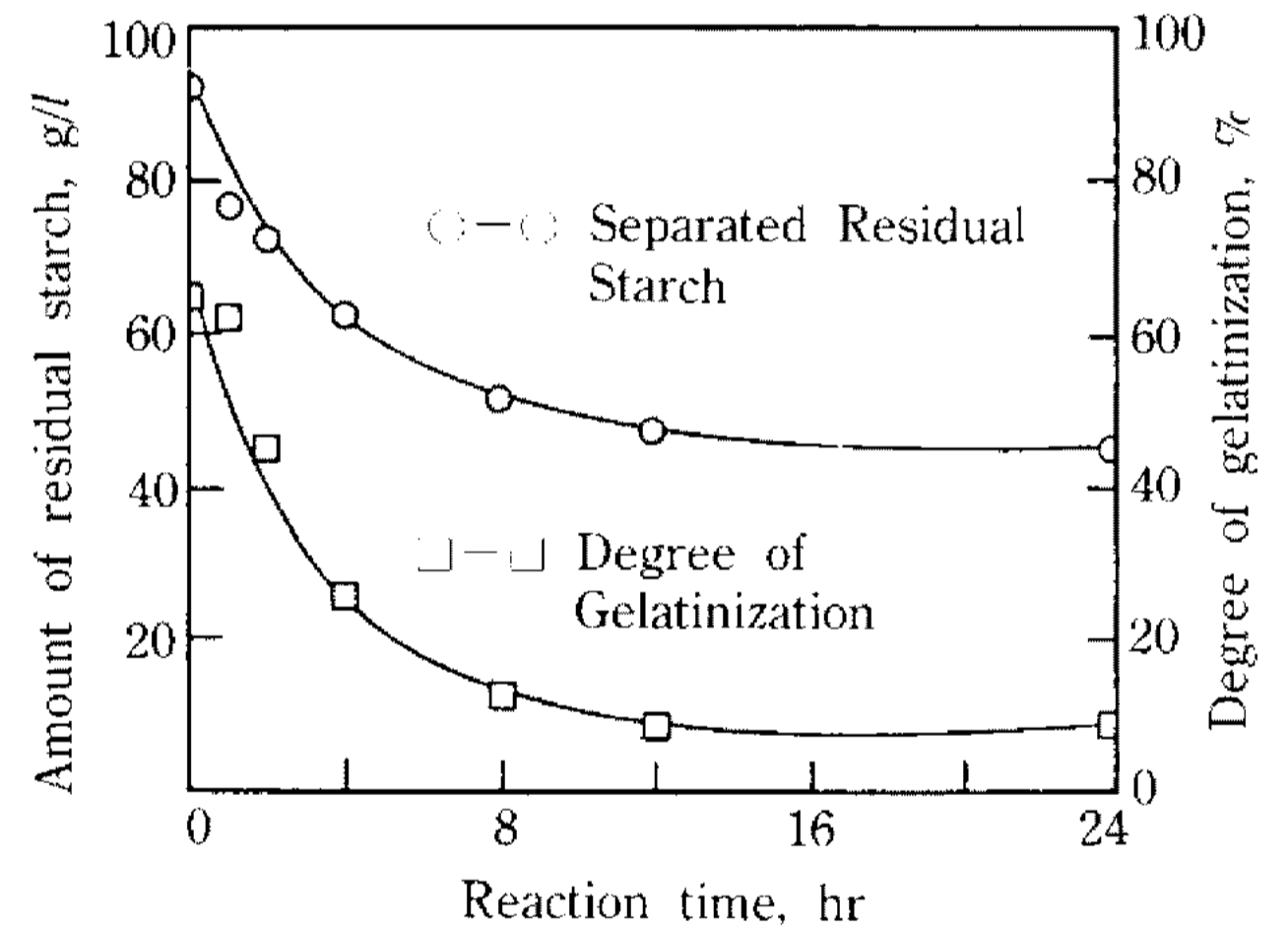
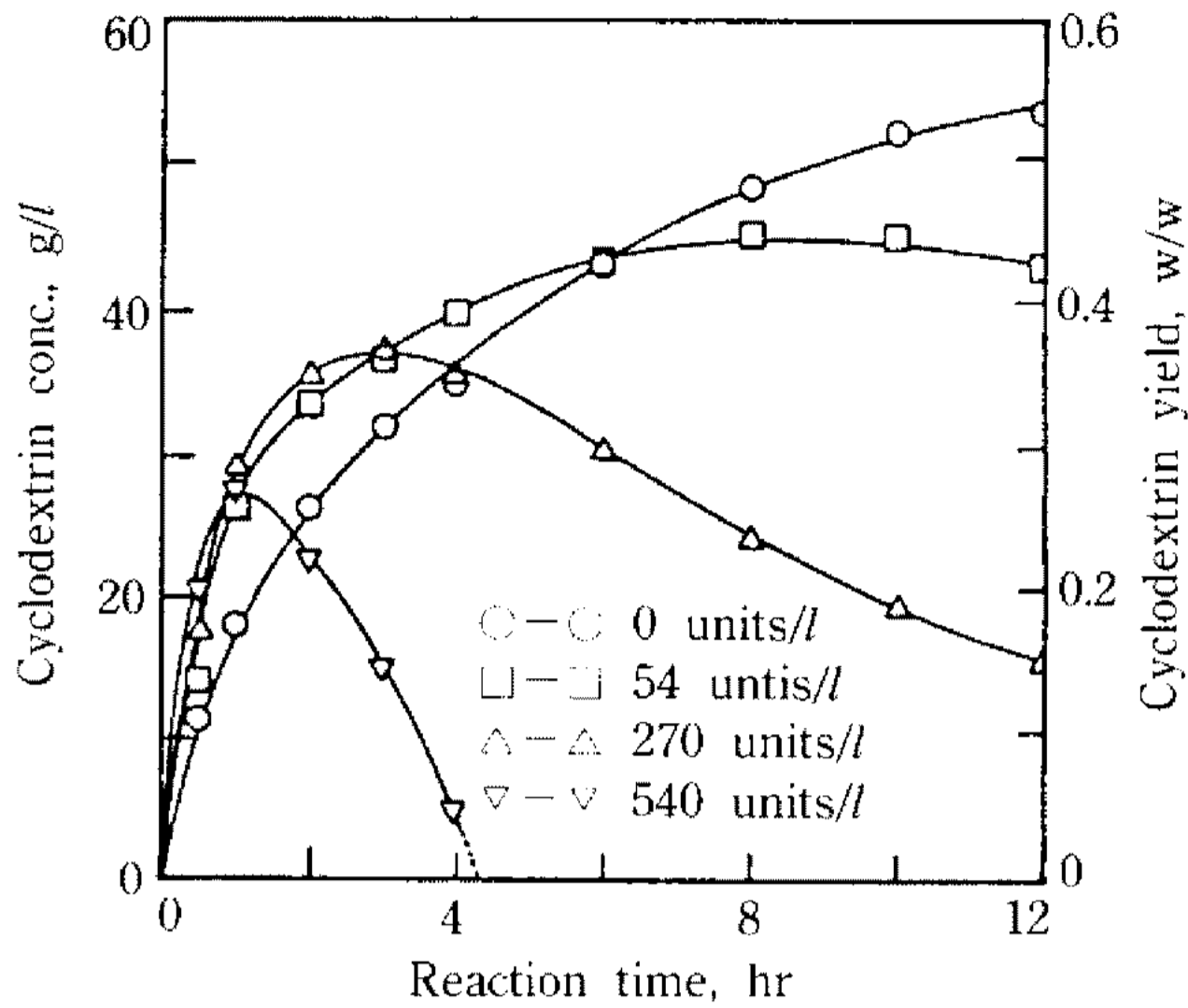


Fig. 5. The amount of separable unreacted residual starch and the degree of gelatinization during CGTase reaction.

100 g/l (w/v) of extruded corn starch, 900 units of CGTase/l, 200 rpm, pH 6.0, and 50°C.

잔류전분의 양과 호화도의 변화를 경시적으로 비교한 결과이다. 24시간 반응 후의 분리된 잔류전분의 양은 45 g/l로서 CD로 전환되지 않은 전분은 8,000×g에서 10분간 처리함으로써 거의 전량 분리가 됨을 알 수 있었다.

사용 extrusion 전분의 초기 호화도는 65%였으며, 효소반응이 진행됨에 따라 급속히 감소하여 8시간 후에 12.5%로 떨어졌으며, 그 이후에는 큰 변동이 없어 24시간 후에는 9.6%였다. 이를 SEM으로 관찰한 결과와 비교하면 팽윤 구조변화된 전분이 CGTase의



**Fig. 6. Effect of supplemental addition of  $\alpha$ -amylase on the production of cyclodextrin.**

100 g/l (w/v) of extruded corn starch, 900 units of CGTase/l, 200 rpm, pH 6.0, and 50°C.

작용을 우선적으로 받는 것을 알 수 있으며, CD 수율을 높이기 위해서는 고호화도의 extrusion 전분(질)을 얻을 수 있도록 처리하는 것이 바람직함을 알 수 있다.

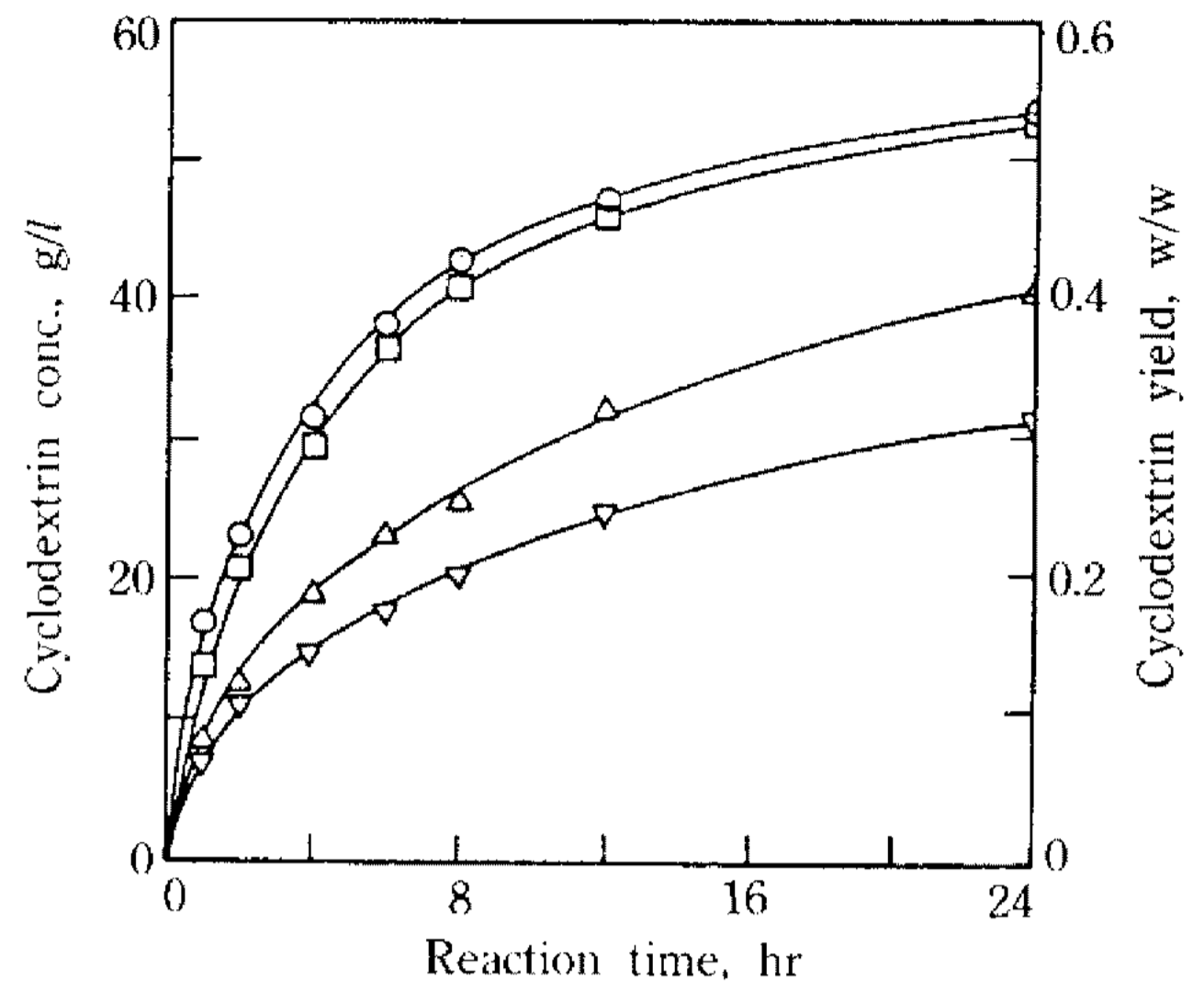
**보조효소 첨가의 영향**

Fig. 6은 extrusion시킨 옥수수전분을 기질로 하여 cyclodextrin을 합성할 경우 액화형 endo-type  $\alpha$ -amylase가 미치는 영향을 검토하기 위하여 효소첨가량을 달리하면서 CD 생성량의 변화를 경시적으로 비교한 결과이다. 보조효소를 첨가하였을 경우 반응초기속도는 첨가하지 않은 경우에 비하여 향상되었으나 반응 후기에는 오히려 감소하는 경향을 나타내고 있으며, 이러한 경향은  $\alpha$ -amylase의 첨가량이 증가할수록 현저하였다.

이는 endo형  $\alpha$ -amylase는 CGTase가 작용할 수 있는 비환원성단말기를 증가시키는 역할을 하여 반응초기에는 CD 생성속도가 증가하지만, 반면 반응후기에는 생성된 CD의 분해작용을 유발하기 때문인 것으로 유추된다(18). 앞으로 CD 생성능이 우수한 효소의 개발은 물론 CGTase의 작용을 보조하면서도 생성된 CD를 분해하지 않는 보조효소의 개발이 요망된다.

**Extrusion시킨 각종 전분기질의 활용**

Fig. 7은 extrusion시킨 불용성 옥수수, 쌀, 보리, 밀



**Fig. 7. Utilization of various kind of extruded starches for CD production.**

100 g/l (w/v) of extruded corn (○), rice (□), barley (△), and wheat (▽) starches, 900 units of CGTase/l, 200 rpm, pH 6.0, and 50°C.

등의 전분질을 기질로 하였을 때의 cyclodextrin 합성양상을 비교한 결과이다. 옥수수 전분질을 그대로 extrusion시켜 사용하였을 경우에도 24시간 후 53 g/l의 CD가 생성되어 extrusion시킨 분리정제된 옥수수 전분과 거의 유사한 CD 합성속도와 수율을 보였으며, 우수한 반응기질임을 알 수 있었다. 또한 extrusion시킨 쌀, 보리전분질의 경우에는 24시간 후 각각 51, 40 g/l의 CD가 생성되었으며, 반면 extrusion시킨 밀전분질은 다소 낮았다. 그러나 일반적으로 extrusion시켜 구조변형시킨 각종 전분질도 우수한 cyclodextrin 합성기질로 활용될 수 있음을 알 수 있다.

**요 약**

Extrusion시켜 구조변형시킨 전분(질)을 기질로 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)를 활용하여 액화과정을 거치지 않고 직접 cyclodextrin을 합성하는 불용성 extrusion된 전분-수용성 CGTase로 구성된 불균일상 효소반응계에 관하여 연구하였다. Extrusion된 전분을 기질로 이용할 경우 기존의 액화전분을 기질로 하는 균일상 효소반응계에서 보다 현저히 증가된 CD 농도, 수율 그리고 합성속도를 얻을 수 있었으며, extrusion된 전분 기질농도가 100 g/l일 때 CD생성량과 수율은 각각 54 g/l와 0.54였다. 반응액은 malto-oligo당의 축적이 적고 주로 고순도의 CD로

구성되는 특이한 조성을 보였으며, 또한 미반응 잔류전분은 쉽게 원심분리할 수 있어 생성된 CD의 분리정제가 용이하였다. Extrusion으로 팽윤된 전분입자는 효소반응 중 CGTase의 작용으로 많은 작은 입자로 fragmentation되는 현상이 관찰되었으며, 호화도의 변화도 CD 합성과 밀접한 관계가 있었다.  $\alpha$ -Amylase를 보조첨가할 경우 초기의 CD 생성속도는 다소 증가되었으나, 생성된 CD가  $\alpha$ -amylase에 의하여 계속적으로 분해되어 최종 수율은 오히려 감소하였다. Extrusion시킨 각종 전분질도 CGTase의 기질로서 적합하였다.

### 감사의 말

이 연구는 한국과학재단지원 농업생물신소재연구센터 1991년 연구비와 (주)양지의 연구비 지원에 의한 것으로, 이에 감사드립니다. Extrusion된 전분을 제공해주신 연성식품에도 감사드립니다.

### 참고문헌

- Whistler, R.L., J.N. Bemiller, and E.F. Paschall: *Starch-Chemistry and Technology*, Second ed., Academic Press, New York, 143 (1984)
- Minamite, Y. and Y. Katsuda: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 152 (1986)
- Hara, K. and H. Hashimoto: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **33**, 152-161 (1986)
- Misaki, M: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **31**, 98 (1984)
- 한국유전공학연구조합: 특허정보자료집-Cyclodextrin(유전공학기술정보 53), 한국유전공학연구조합, 서울 (1988)
- Hashimoto, H., K. Hara, N. Kuwahara, and K. Arakawa: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **32**, 299 (1985)
- 신현동, 이상호, 이용현: *산업미생물학회지*, **17**, 370 (1989)
- Lee, S.H., H.D. Shin, and Y.H. Lee: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 54 (1991)
- Lee, Y.H., S.H. Lee, and H.D. Shin: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 63 (1991)
- 이용현, 이상호, 한일근: *산업미생물학회지*, **19**, 171 (1991)
- 한일근, 이용현: *산업미생물학회지*, **19**, 163 (1991)
- 박동찬, 이용현: *산업미생물학회지*, **18**, 260 (1990)
- Korn, S.R. and J.K. Harper: *Biotechnol. Lett.*, **4**, 417 (1982)
- Lee, Cheryl-Ho: *Proceedings of Seoul International Food Extrusion Workshop '90*, Korea Society of Food Extrusion Research, Seoul, p. 1 (1990)
- Linko, P., Y.Y. Linko, and J. Olkku: *J. Food Eng.*, **2**, 243 (1986)
- Wootton, K.W., C. Weeden, and N. Munk: *Food Technol.*, **23**, 612 (1971)
- Schmid, G.: *Tibtech*, **7**, 244 (1989)
- Kuge, T. and K. Takeo: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **21**, 151 (1974)

(Received August 12, 1991)