

Aspergillus niger CF-34 효소를 이용한 두부 또는 두유비지의 가용화

김강성 · 박은하 · 최연배 · 김교창* · 이상화** · 손현수
(주)정·식품 중앙연구소, *충북대 식품공학과, **서원대 식품영양학과

Solubilization of Tofu-Residue Using Multienzyme Derived from *Aspergillus niger* CF-34

Kang Sung Kim, Eun Ha Park, Choi Yeon Bae, Kyo Chang Kim*
Sang Hwa Lee** and Heon Soo Sohn

Dr. Chung's Food Co. Ltd., *Chung Buk University, **Seowon University

Abstract

Solubilization of plant cell wall(tofu-residue) using enzyme complex obtained by culturing *Aspergillus niger* CF-34 was attempted. The hydrolysis reaction was done at pH 4.0, 50°C, which were optimum pH and temperature of the enzyme, respectively. At the enzyme dosage of 2.5% (in terms of solid content of tofu-residue) and reaction time of 3 hr, the solubilizing percent of protein and carbohydrate were 62% and 50% respectively. Homogenization prior to enzyme reaction did not have much effect on tofu-residue solubilization. To improve solubility of tofu-residue, additional treatment such as alkali with 0.1% NaOH solution was found to be useful. The results showed that tofu-residue, which mainly consists of cell wall component of cellulose and hemicellulose, was not accessible to enzyme reaction and some prior treatment is required to enhance enzyme hydrolysis.

Key words: Solubilization, tofu-residue, hydrolysis, plant cell wall

서 론

식물세포벽 분해효소는 열명 macerating enzyme으로 일컬어지기도 하며, 불용성인 식물세포벽을 분해시킴으로써 세포내 유용물질을 쉽게 얻을 수 있게 해 준다. 현재 외국에서 수입이 되는 관련 효소제품은 수종이 있으며, 국내에서의 생산은 없는 실정이다. 따라서 이 복합효소를 생산함으로써 수입에 의존하고 있는 식물세포벽 분해효소의 수입을 대체하고 향후 생산에 관한 연구를 통해 효율적으로 세포벽을 분해할 수 있는 효소 체계를 구축하고 경제적인 방법을 통해 생산함으로써 제품 경쟁성을 높이고, 응용분야를 개발함으로써 식물체로부터의 유용물질 추출효율을 높이고 또한 원료식물체의 가공공정에 적용하여 생산성을 높일 수 있다^{1) 2)}.

한편 두부 또는 두유를 생산할 때 부산물로 발생되는 비지 및 식용유 생산의 부산물인 대두박은 전형적인 미이용 자원으로서 단백질, 지방, 탄수화물 등을 다량 함유하고 있으며, 현재 대개는 건조하여 사료로 사용이 되거나 폐기되고 있는 실정이다^{3) 4)}. 칼지대두박의 경우는 발효산업에서 배지성분으로 널리 이용이 되어오고 있으나, 비지의 경우는 거의 연구가 되지 못하고 있다.

따라서 본 연구는 첫째, 위와같은 조성을 가진 비지를 발효의 기질로 사용하여 효소의 생산에 적합한지의 여부를 판명함으로써 향후 발효산업에의 응용분야를 개척하고 둘째, GRAS 균주로 알려진 균주 중에서 세포벽 분해활성이 뛰어난 균주를 선정하며 셋째, 이 균주를 이용하여 경제적으로 효소를 생산하기 위한 배지조성, 배양조건, 배양방법 등을 연구하여 효소생산법을 확립하며 넷째, 생산된 효소를 이용하여 미이용자원인 비지 및 대두박으로부터 대두단백질의 추출 효율을 높임으로써 효율적인 식물자원의 이용을 꾀하고, 기타 식물체에 서의 유용물질의 추출증대를 그 목적으로 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 비지는 두부 또는 두유생산시 부산물로 얻어지는 비지를 냉장 저장(약 4°C)하여 사용하였다.

조효소액의 발효생산

5l 발효조에 배지를 3l 넣고 pH를 5.0으로 조절한 후 121°C에서 30분간 멸균시킨 후 선정된 균주의 포자현탁액을 10⁶/ml이 되도록 접종하여 30°C에서 300 rpm으로 교반하면서 배양을 하였다. 이때 통기량은 1 vvm이었으

며, silicone 소포제로 기포발생을 억제하였다. 배지조성은 3% 비지, 0.8% pectin, 0.3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄·7H₂O 이고, 초기 pH는 5.0이었다. 배양이 종료되면 배양액을 여과하여 이를 조효소액으로 하였다.

비지액화반응

고형분 4% 비지용액을 복합효소액 반응조건 실험에서 선정된 최적 pH(pH 4.0) 및 최적온도(50°C)로 효소반응 조건을 맞추고, 효소량을 비지 고형분량에 대하여 1.25% (V/Wt)에서 7.5%까지 각각 첨가하여 3시간동안 반응시킨 후 원심분리(14,800×g, 15분)하여 침전물을 건조정량하였다. 비지 반응액 중의 총고형분량에 대한 복합효소액 작용후의 가용화된 고형분량의 백분율로 표시하여 복합효소액의 최적사용량을 선정하였다.

효소반응 시간별 비지의 용해도 측정

고형분 4% 비지용액을 복합효소액의 적정 반응조건 (pH 4.0, 50°C)으로 조정 한 후 복합효소액 농도를 비지 고형분량에 대하여 2.5% (v/w) 첨가하여 6시간 동안 반응시키면서 각 시간별로 가수분해된 비지용액을 취했다. 채취된 비지용액을 pH 7.0으로 재조정하고 원심분리 (14,800×g, 15분)하여 침전물 및 상등액을 각각 취했다.

가용화된 고형분을 정량하여 두유비지 반응액중의 총 고형분량에 대한 백분율로 표시하여 두유비지내의 고형분 용해도를 측정하였다. 원심분리된 상등액의 조단백을 micro-kjeldahl(Buchi 321, Switzerland)법으로 가용화된 비지단백질의 회수율을 측정하였다.

균질에 의한 비지입자의 가수분해에 대한 효과

복합효소액 처리시 비지입자의 크기가 가수분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 균질유무에 따른 가수분해 정도를 측정하였다. 먼저, 고형분 4%의 비지용액을 균질 (150/50 kg/cm², Gauline MC45, U.S.A.)하여 균질하지 않은 시료와 구분하고, 각각의 시료를 효소의 적정반응 조건(pH 4.0, 50°C)에서 복합효소액을 처리(비지 고형분의 2.5%, v/w)하고 180분간 반응하면서 시간별로 시료를 채취하여 끓는 물에서 3분간 실활하고 원심분리 (7,600×g, 15분)하여 상등액을 취했다. 취해진 상등액을 phenol sulfuric acid법으로 균질유무에 따른 비지 가수분해에 미치는 영향을 조사하였다.

Product inhibition 영향

복합효소액의 가수분해로 생성되는 두유비지의 가수분해물이 두유비지 주위에 축적되어 효소작용을 저해하는 생성물 억제(product inhibition)가 일어나는가 여부를 확인하는 실험을 행하였다.

고형분 4%의 비지용액시료 3개를 준비하고 각각의 시료를 복합효소액의 적정반응 조건(pH 4.0, 50°C)으로 맞췄다. 3가지 시료에 동일하게 복합효소액(고형분량의

2.5%)을 첨가하여 첫번째 시료는 240분까지 계속 반응시키고, 두번째 시료는 효소반응 시작후 100분에서, 세번째 시료는 효소반응 시작후 180분에서 각각 복합효소액을 추가로 초기 첨가량과 동일하게 첨가하여 반응시켰다.

각 시료별 효소반응 유액을 시간별로 채취하여 끓는 물에서 3분간 실활하고 원심분리(7,600×g, 15분)하여 상등액을 취한다. 취해진 상등액을 phenol sulfuric acid법으로 측정하여 시료별 가수분해 특성을 분석하였다.

화학적 전처리 효과

비지를 alkali로 전처리하여 효소가수분해 특성을 분석하였다. 4%의 비지시료를 0.1% NaOH 용액으로 pH 10.8로 조정 한 시료와 pH를 조정하지 않은 시료를 실온에서 30분간 교반하여 각 시료를 복합효소액의 적정 반응조건으로 조정하고 효소를 처리하여 180분간 반응시켰다. 두 시료의 효소반응 유액을 시간별로 취하여 끓는 물에서 3분간 실활하고 원심분리(7,600×g, 15분)하여 상등액을 취하고 phenol sulfuric acid법으로 측정하여 시료별 가수분해 특성을 분석하였다.

결과 및 고찰

Aspergillus niger CF-34로부터 얻은 효소를 이용하여 비지의 가용화를 시도하였다(Fig. 1). 이때 반응온도 및 반응 pH는 각각 50°C, 4.0으로 하여 수행하였다. 효소를 산업적으로 이용하는 경우에 있어서 효소의 사용량은 생산하고자 하는 최종제품 생산비용의 상당부분을 차지하기 때문에 효소량은 줄이고 반응시간을 증가시키는 것이 효과적인 효소이용 방법으로 사료되며, 따라서 본 비지의 가용화에 있어서도 적정효소액 사용량은 경제성 등을 고려할 때 매우 중요한 요인이다.

고형분 4%의 비지 용액 100 ml에 복합효소액을 1.25~7.5%(비지건량 %) 농도로 첨가시 비지고형분의 가용화도는 Fig. 1과 같다. 복합효소액의 첨가량이 증가할수록 두유비지의 고형분 용해도도 계속 증가하나, 1.25% 이상의 농도에서는 용해도의 증가폭이 점차 감소되어 2.5%의 효소농도에서는 두유비지 고형분의 약 50%까지 가수분해되었으나, 복합효소액의 첨가량을 2배씩 증량하여도 고형분 용해도 증가폭은 약 5% 이하의 소폭증가를 보였다.

따라서, 본 실험결과에서는 두유비지 고형분의 약 50%를 가용화하는 2.5%를 적정복합효소액 농도로 선정하였다.

효소 반응시간별 비지의 용해도

전술한 실험결과에서 얻어진 복합효소액의 최적반응 조건(pH 4.0, 50°C) 및 적정 효소농도(2.5% of T.S.)를 기준 실험조건으로 하여 효소반응 시간별 상등액의 단백질 함량 및 침전물의 고형분 함량을 분석하여 효소

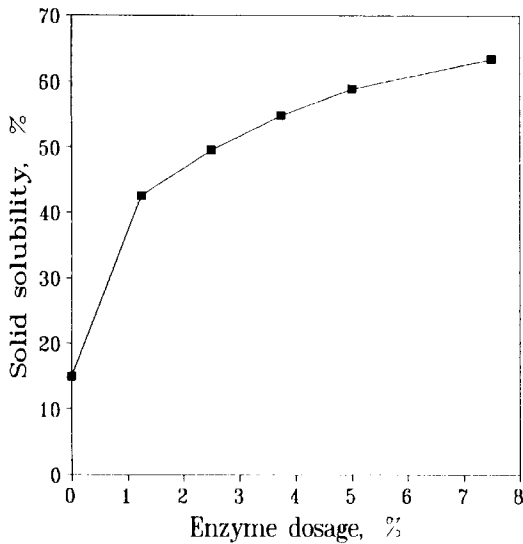


Fig. 1. Effect of enzyme dosage on solubilization of tofu-residue

작용에 의한 단백질 회수율 및 고형분 용해도를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다.

실험결과에서 초기 1시간까지의 반응에서 단백질회수율 및 고형분 용해도는 급격히 증가하였으나, 반응 1시간 후부터는 가수분해 속도가 초기속도보다 감소하는 경향을 보이면서 효소반응 후 3시간에서 단백질회수율과 고형분 용해도는 각각 62%, 50%를 기록하였다. 이 결과는 Eriksen⁽¹³⁾이 보고한, 효소처리시 전지대두분의 hydrolysis pattern과 유사하였고 한과 황⁽¹⁴⁾, 차와 윤⁽¹⁵⁾의 효소 처리에 의한 대두단백질의 기능특성 연구결과에서 보고된 분리대두단백의 반응시간별 가수분해 형태와도 유사한 특성을 보였다.

효소처리에 의한 비지단백질의 가용화 특성을 비교분석하여 보면, 이와 김^(16,17)은 natto protease 및 koji protease를 이용한 두유비지 단백질 용출실험에서 각각 63%, 70%씩 용출되었다고 보고하였고, 김 등⁽¹⁸⁾은 *Aspergillus sojae*를 이용한 대두단백질 분해 이용 연구에서 대두단백질을 최대 70%까지 용출하였다는 결과를 보고하여 본 실험결과와 유사하거나 약간 높은 단백질 회수율을 기록하였다. 이에반해 이 등⁽¹⁹⁾은 두부비지를 blade ground로 2회 처리하여 단백질을 29.2% 회수하였고, Sharma와 Joseph⁽³⁾은 대두박(soybean meal)에 *Aspergillus terreus* 유래의 세포벽 분해효소 처리시 단백질 용출에는 효과가 없었다고 보고하여 본 실험결과가 단백질 용출에 있어서 상대적으로 우수하였다.

복합효소액 처리에 의한 두유비지의 고형분 용해도 특성은, 초기 1시간 반응에서 고형분의 약 47%가 용해되었고, 3시간 반응에서 50%, 6시간 반응에서 58%의 고형분 용해도를 나타내어 반응 1시간 후부터는 가수분

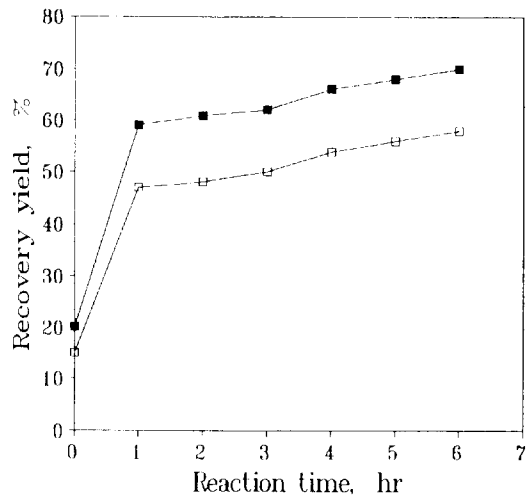


Fig. 2. Effect of reaction time on solubilization of tofu-residue

■—■: Protein, □—□: Solid

해 속도가 초기속도보다 감소하는 경향을 보였다. 이러한 두유비지 고형분의 가수분해 특성은 Eriksen⁽¹³⁾이 보고한 전지대두분의 고형분 용해도와 유사하였다.

상기자들의 연구결과와 본 실험결과에서 얻어진 대두 고형분의 용해도 특성을 직접 비교, 분석할 수는 없으나 기질내 불용성 물질의 조성이 높고, 효소반응시간이 짧은 점 및 화학적 처리제를 사용하지 않은 점 등을 고려할 때 복합효소액의 처리가 비지의 효과적인 가용화 및 산업적 이용에 그 타당성이 높은 방안으로 생각된다.

Fig. 2에서 반응시간별 단백질 회수율 및 고형분 용해도는 거의 일정한 간격을 유지하는 특성을 볼 수 있다. 이러한 가수분해 특성은 진술한 바와 같이 복합효소액의 특성에 기인하는 것으로 생각된다. 즉, 본 실험에 사용한 복합효소액은 cellulase, pectinase, CMCCase 및 xylanase 등을 포함하는 복합 탄수화물 분해효소 특성을 갖고 있어 두유 비지내의 세포벽 성분에 이 효소가 먼저 작용하여 가수분해되고 아울러 세포벽 분해로 인해 내부의 단백질체가 용출됨에 따라 Fig. 2와 같은 단백질 용출 및 고형분 용해특성을 보이는 것으로 판단된다. 한편 Fig. 2에서 비지의 가수분해 특성은 일정량의 효소첨가로 반응시간이 증가함에 따라 단백질 및 가수분해도가 계속 증가하나 그 속도는 점차 감소되는 경향을 보이면서 가수분해의 포화현상을 나타내었다.

효과적인 가수분해 반응은 짧은 반응시간에서 높은 가수분해율이 요구된다. 그러나 본 실험결과(Fig. 2)에서는 두유비지의 가수분해 곡선이 반응초기 1시간 까지는 급격한 증가를 보이고, 시간이 경과할수록 분해곡선의 증가가 완만하였다. 효소가수분해 반응에서 이와 같이 소정의 가수분해도에 이르는 반응시간이 지연되는 가수분해 저해인자로서는 기질의 입자크기⁽²⁰⁾, 생성물 억제⁽²¹⁾

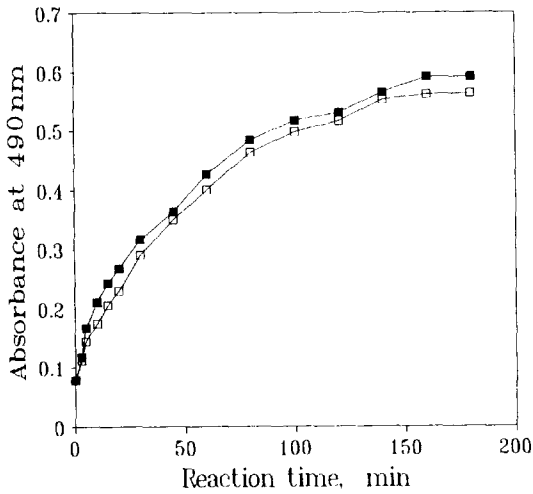


Fig. 3. Homogenization effect on solubilization of tofu-residue by the multienzyme
□—□; Non-homogenization, ■—■: Homogenization

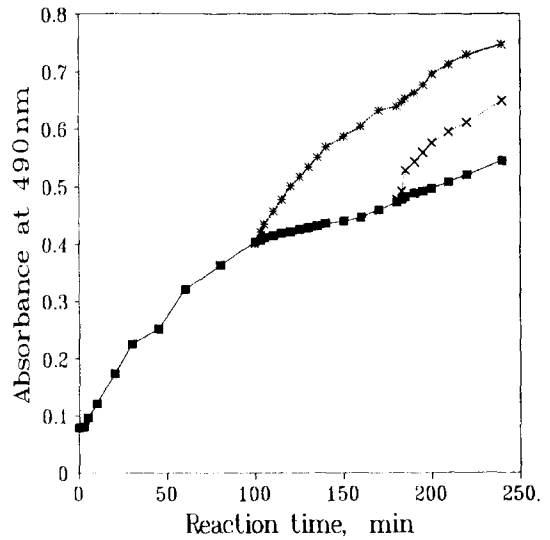


Fig. 4. Effect of intermittent enzyme addition on hydrolysis of tofu-residue

및 기질의 구조⁽²²⁾ 등이 영향을 주는 인자로 알려졌다. 따라서 본 연구에서도 복합효소액 처리시 비지 가수분해의 저해인자로 작용하는 요인을 분석하였고, 그 결과는 다음과 같다.

입자크기의 영향

물리적 전처리 방법의 하나인 균질처리로 물리적인 힘을 가하여 기질입자를 미분함으로써 효소가수분해 효율을 증가시키는 방안⁽²³⁾을 본 실험에 적용하였다.

균질 전후의 입자 크기는 현미경으로 관찰한 결과 미균질 비지에 비하여 균질된 비지는 입자크기가 현저히 감소하였으나, 균질 회수에 따른 입자의 크기변화는 그다지 크지 않았다.

고형분 4%의 비지용액을 균질한 용액과 균질하지 않은 용액으로 구분하여 복합효소액을 처리한 결과는 Fig. 3과 같다. Mandels 등⁽²⁰⁾은 폐기되는 섬유소를 균질로 전처리하여 cellulase 처리시 그 분해율 및 분해시간을 단축한다고 하였으나, 본 실험에서는 균질유무에 따른 효소가수분해도는 근소한 차이를 보였고, 가수분해 경향도 Fig. 3과 유사하여 가수분해율 증가 및 가수분해 시간의 단축에는 영향을 주지 못하였다.

이와 같은 가수분해 특성은 균질로 미분된 비지입자가 복합효소액 작용 pH인 4.0으로 조정되면서 다시 응집된 요인과, 또다른 요인으로서는 균질효과가 복합효소액이 충분히 작용할 수 있는 작은 입자까지 미분되지 못한 것으로 해석된다.

Product inhibition 영향

Khan 등⁽²¹⁾, Gong 등⁽²⁴⁾, Maguire⁽²⁵⁾는 섬유소 가수분해로 생성되는 cellobiose, 포도당 등과 같은 최종 생성

물이 섬유소 효소 가수분해반응을 저해하여 결과적으로 섬유소가당으로 전환되는 효율이 낮아지고, 당화공정에서 가장 높은 생산비용을 차지하는 효소의 이용성이 충분하지 못하다고 지적하였으며, 또한 최종 생성물 저해의 영향으로 기질의 가수분해도 부분적으로 진행되는 점 등의 문제점을 언급하였다.

본 연구에서도 Fig. 2와 같이 진행되는 가수분해 곡선이 복합효소액이 두유비지를 가수분해하면서 발생하는 최종 생성물 저해의 영향인가를 확인하였고, 그 결과는 Fig. 4와 같다.

실험결과에서 두유비지의 효소가수분해로 생성되는 최종 생성물이 비지 주위에 축적되었다면 효소를 다시 첨가하여도 가수분해는 증가할 수 없으나 Fig. 4에서의 가수분해도는 반응진행중 효소의 추가적 첨가에 의해 계속 상승하였다. 따라서, 복합효소액을 처리한 두유비지의 가수분해 과정에서는 생성물 저해가 발생하지 않는 것이 확인되었다.

알칼리 전처리에 의한 영향

Kugimiya⁽²⁶⁾는 대두자엽조직(soybean cotyledon tissues)에 염산용액과 수산화나트륨용액을 순차적으로 처리하여 대두자엽조직을 완전히 분해한 연구결과를 발표하였고, Han과 Callihan⁽²²⁾은 볏짚 및 사탕수수 잔사에 4% NaOH 용액을 100°C 에서 15분간 처리하고 효소가수분해하여 섬유소 분해율을 29.4%에서 73%로 증가시켰다고 보고하였다. Fan 등⁽²³⁾은 lignocellulosic 물질에 묽은 NaOH 용액을 처리하여 팽윤시킴으로써 섬유소물질의 내부면적을 증가시키고, 중합도 및 결정도를 감소시켜 리그닌과 탄수화물 사이의 구조적 결합을 분해하

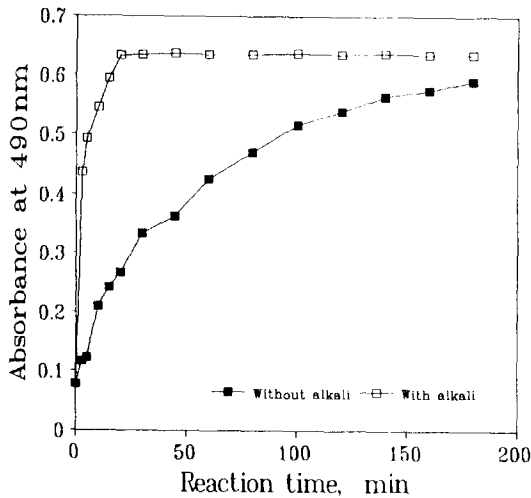


Fig. 5. Effect of alkali pretreatment on solubilization of tofu-residue by the multienzyme
 ■—■; Without alkali, □—□; With alkali

으로서 lignin의 구조도 붕괴된다고 하였다.

효소분해 반응에 있어서도 기질의 구조가 갖는 특성이 효소가수분해 반응속도에 영향을 주기 때문에 본 연구에서도 두유비지에 NaOH를 처리하여 그 기질구조의 변형을 유도하고 효소처리하므로서 나타나는 가수분해 특성을 분석하였다(Fig. 5). 실험결과에서 alkali 처리된 두유비지의 효소가수분해 반응은 초기반응시간 20분 까지 가수분해도가 급격히 증가되고 반응시간이 계속 경과하여도 일정한 가수분해도를 유지하였으나, alkali 처리되지 않은 두유비지 용액은 반응 3시간까지 계속 가수분해도가 증가되나 alkali 처리된 두유비지보다 가수분해도가 낮았다.

이러한 결과는 Fan 등⁽²³⁾의 실험결과와 같이 효소반응의 전처리제로 사용한 NaOH 용액이 두유비지에 팽윤제로 작용하여 섬유소를 포함한 비지나 불용성 물질의 구조를 비결정으로 변형시키고, 비지입자의 표면적도 증가됨에 따라 복합효소액이 작용하는 기질의 가수분해도가 상승된 것으로 판단된다.

따라서, 두유비지에 복합효소액만을 단독처리시 발생하는 가수분해 저해인자로서 비지입자 구조가 관여하는 요인으로 분석되었다.

이상과 같은 실험에서 *Aspergillus niger* CF-34로부터 얻은 조효소액이 비지의 가용화에 이용될 수 있음을 확인하였다.

요 약

두유 및 두부제조시 부생되는 비지를 효과적으로 이용하기 위한 방안으로 *Aspergillus niger* CF-34로부터 얻은 효소를 비지에 처리하여 가용화를 시도하였다.

비지가용화를 위한 본 연구에서 비지에 작용하는 복합효소액의 최적반응조건을 조사하였으며, 복합효소액 처리시 두유비지내 불용성 단백질의 회수율 및 고형분 용해도와 비지의 효소가수분해 특성을 검토하였고, 그 결과는 다음과 같다.

- 복합효소액의 사용량은 비지 고형분의 약 50%를 가용화하는 2.5%(% of total solid)를 최적 복합효소액의 농도로 선정하였다.

- 효소작용시간에 따른 비지의 단백질 회수율 및 고형분의 용해도는 효소반응후 3시간에서 각각 약 62%, 50%로 상대적으로 높은 값을 나타내었다.

- 비지를 alkali 처리(0.1% NaOH)로 그 입자구조를 변형시킴으로서 효소가수분해율이 증가되었고, 가수분해 시간도 단축됨에 따라 비지 가수분해의 효과적인 전처리방법임을 확인할 수 있었다.

문 헌

1. Kikuchi, T., Ishii, S., Fukushima, D. and Yokosuka, T.: Food-chemical studies on soybean polysaccharides. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 45(5), 228(1971)
2. Godfrey, T. and Reichet, J.: The application of the enzyme in industry. In *Industrial Microbiology*, The Nature Press, New York, p.340(1983)
3. Sharma, A. and Joseph, R.: Studies on the application of plant cell wall degrading enzymes from *Aspergillus terreus* and *Neurospora crassa*. *Biotechnol. Lett.*, 5(7), 481 (1983)
4. Hara, T., Fujio, Y. and Ueda, S.: Production of polygalacturonase by *Aspergillus niger* cultured in the medium containing mandarin orange peel. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29(9), 538(1982)
5. Moresi, M., Clementi, F., Rossi, J., Medici, R. and Vinti, G. L.: Production of biomass from untreated orange peel by *Fusarium avenaceum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 37(1987)
6. Wicker, L., Vassallo, M.R. and Cheverria, E.J.: Solubilization of cell wall bound, thermostable pectinesterase from valencia orange. *J. Food Sci.*, 53(4), 1171(1988)
7. Seymour, T., Preston, J.F., Wicker, L., Lindsay, J.A. and Marshall, M.R.: Purification and properties of pectinesterases of marsh white grapefruit pulp. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1080(1991)
8. 정성수, 장호남, 박무영: 암자여과와 열풍에 의한 비지의 건조. *한국식품과학회지*, 10(1), 1(1978)
9. 최상용: 두유비지의 성분 및 건조조건에 관한 연구. 고려대학교 농과대학 석사학위논문, (1982)
10. 김우정, 김동희, 오훈일: 용매처리에 의해 건조된 두유비지의 이화학적 성질에 관한 연구. *한국식품과학회지*, 16(3), 261(1984)
11. 김우정, 손정우, 정성수: 용매의 세척회수가 건조비지의 품질에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, 17(2), 95(1985)
12. 김재욱, 허병석, 박우포: 두유박을 이용한 보리된장 제조. *한국농화학회지*, 32(2), 91(1989)
13. Eriksen, S.: Application of enzymes in soy milk production to improve yield. *J. Food Sci.*, 48(2), 445(1983)
14. 한진숙, 황인경: 효소처리가 대두단백질의 기능특성과

- 두부의 품질에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 24(3), 294(1992)
15. 차명화, 윤 선: 단백질 분해 효소에 의한 대두단백의 기능적 특성변화. 한국식품과학회지, 25(1), 39(1993)
 16. 이상민, 김재욱: 납두균 효소를 이용한 두유박 단백질의 용출. 한국농화학회지, 33(4), 282(1990)
 17. 이상민, 김재욱: 코오지균 효소를 이용한 두유박의 단백질 용출. 한국농화학회지, 35(1), 64(1992)
 18. 김재욱, 조무재, 김상순, 이춘녕: 미생물을 이용한 대두 단백질 분해 이용연구. 한국농화학회지, 12, 19(1969)
 19. 이원중, 최미라, Sosulski, F.W.: 콩비지의 식이섬유와 단백질 분리. 한국식품과학회지, 24(1), 97(1992)
 20. Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J.: Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1471(1974)
 21. Khan, A.W., Chin, A. and Baird, S.: Use of charcoal to minimize end product inhibition in enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Lett.*, 7(6), 447(1985)
 22. Han, Y.W. and Callihan, C.D.: Cellulose fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth. *Appl. Microbiol.*, 27, 159 (1974)
 23. Fan, L.T., Lee, Y.H. and Gharpuray, M.M.: *Adv. Biochem. Eng.*, Vol. 23, Springer-Verlag Heidelberg New York Press p.167-174(1982)
 24. Gong, C.S., Ladish, M.R. and Taso, G.T.: Cellobiase from *Trichoderma viride*: Purification, properties, kinetics, and mechanism. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 959(1977)
 25. Maguire, R.J.: Kinetics of hydrolysis and ρ -nitrophenyl- β -D-glucoside by cellobiase of *Trichoderma viride*. *Can. J. Biochem.*, 55, 19(1977)
 26. Kugimiya, M.: Disintegration of cotyledon tissues of soybeans by successive treatments with acid and alkali. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39(11), 1001 (1992)

(1993년 12월 18일 접수)