

알칼리 내성 *Bacillus* sp.가 생산하는 Amylase의 생전분 분해 특성

†이 신 영 · ¹조택상

강원대학교 환경·생물공학부 및 연세대학교 생물산업소재연구센터,
¹(주) 김정문 알로에 연구소

(접수 : 1998. 5. 20., 게재승인 : 1998. 9. 15.)

Hydrolysis Characteristics of Amylase from Alkaline-Tolerant *Bacillus* sp. on the Raw Starch

Shin-Young Lee† and Taek-Sang Cho¹

Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹R & D Center, Kim Jeong Moon Aloe Co, Ltd., Cheonan 330-880, Korea

(Received : 1998. 5. 20., Accepted : 1998. 9. 15)

The raw starch hydrolysis by amylase prepared from alkaline-tolerant *Bacillus* sp. were investigated. Degree of hydrolysis(%) of 5%(w/v) raw rice, corn and potato starch by this enzyme were about 40, 25 and 20%, respectively. The hydrolysis action on raw starch by change of blue value was similar to the action pattern of exo β-amylase. The hydrolysis products of rice starch were mainly glucose and maltose. Oligosaccharides were also detected. From the above results, this enzyme was considered as exo type α-amylase. This enzyme activity on the raw starch and the gelatinized starch were 28.40 and 86.60 IU/mg protein, respectively, and the ratio of raw starch-digesting activity to gelatinized starch-digesting activity (raw starch digestivity) was about 32%. The Km values for the raw and the gelatinized starch were 4.22 and 3.0mg/mL, respectively, and the Vmax values were 0.20 and 0.31mg/mL/min, respectively.

Key word: alkaline-tolerant *Bacillus* sp., raw starch-digesting amylase, hydrolysis, action pattern

서 론

생전분 분해 amylase를 이용하여 전분의 증가 과정없이 당화하는 무중자 당화 방법은 그동안 전분의 amylase 이용 공정 중 에너지를 보다 근본적으로 절약할 수 있는 방법의 하나로서 널리 주목받아 왔다(1-3). 하지만 아직까지도 효소의 호화전분 분해능에 대한 생전분 분해능의 비율은 3.3-26% 정도로 매우 낮아서(4) 실용화의 목적을 위하여는 보다 강력히 생전분을 액화 또는 당화하는 생전분 분해 효소 생산균의 탐색이 필요하다.

그동안 이 등(5,6)은 토양으로부터 분리한 알칼리 내성의 *Bacillus* sp.로부터 생전분 분해능을 갖는 효소를 탐색하여 이 효소의 생산 조건을 검토하였고, 또 이 균주가 생성한 생전분 분해 효소를 정제하여, 그 특성을 조사, 보고한 바 있었다. 본 균주의 효소는 분자량 19,000의 동일한 2개 subunit로 구성된 2

량체 효소로 내열성(80℃)을 가지며, 호화전분에 대한 생전분의 활성비가 높아서 이 효소에 대한 추가 검토의 필요성이 높다고 생각되었다.

따라서 본 연구에서는 이 효소의 생전분 기질에 대한 가수분해 특성 및 작용 양상을 검토하였으며, 아울러 효소 활성에 미치는 기질 농도의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 이 등(5,6)이 토양에서 순수 분리한 알칼리 내성 *Bacillus* sp.이다. 균주는 soluble starch 30g/L, glucose 3g/L, yeast extract 5g/L, soybean meal 5g/L, KH₂PO₄ 3g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5g/L, Na₂CO₃ 10g/L, agar 20g/L(pH 10.0)의 사면배지로 30℃에서, 12시간 배양한 후 4℃에서 보존하였으며, 4주마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

배양 및 효소의 분리·정제

배양은 이 등(5)이 최적 배지로 보고한 glucose 20g/L, yeast extract 10g/L, KH₂PO₄ 1g/L, Na₂CO₃ 1.2g/L로 구성된 pH

† Corresponding Author · Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.
Tel : (0361) 250-6273, Fax : (0361) 243-6350
e-mail: sylee@cc.kangwon.ac.kr

7.5의 베지에 증균 배양액 1.5%(v/v)를 접종하여 30°C에서 100rpm으로 42시간 동안 플라스크 진탕 배양하였다.

배양이 끝난 배양액은 8000rpm으로 20분간 원심분리한 다음, 상등액을 취하여 조효소액으로 하였고, 이 조효소액(0.156 IU/mg protein)을 이 등(6)의 보고에 따라 ethanol 침전, ion exchange chromatography (DEAE-cellulose, column: 2×30cm) 및 gel chromatography (Sephadex G-75, column 2×45cm)하여 정제하였다. 이와 같이 정제한 효소의 비활성은 29.270 IU/mg protein으로 정제도는 조효소액의 약 180배이었다.

생전분 분해능의 관찰

생전분의 분해능은 생전분을 효소처리한 후, 전분의 표면구조를 주사형 전자 현미경(Philips model, SEM 501)을 사용하여 촬영하고, 전분입자의 분해 또는 손상 여부를 생전분과 비교하여 관찰하였다. 전자현미경 촬영은 시료를 접착 테이프에 얇게 분산시킨후, 금으로 진공증착(100Å)하고 전압 3kV, 시료경사 30°의 조건에서 5,000배로 촬영하였다

생전분 분해효소의 활성 측정

Kanuma 등(4)의 방법을 변형하여 다음과 같이 효소활성을 측정하였다. 즉 생전분 20mg을 증류수 1.6mL에 현탁시킨 후, 0.1M acetic acid 완충 용액(pH 5.5) 0.2mL를 첨가하여 효소 반응의 기질 용액으로 사용하였다. 기질 용액을 50°C에서 5분 동안 preincubation하고, 이 용액에 효소액 0.2mL를 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 이 때, 반응의 정지는 끓는 물에서 5분간 가열하여 행하였다. 분해되지 않은 생전분은 12,000×g에서 5분간 원심분리하여 제거하였으며, 생성된 환원당의 양을 DNS법(25)으로 비색 측정하였다. 효소의 활성은 효소액 1 mL가 1분당 1 μmol의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 IU(International Unit)로 하였다. 한편, 단백질의 농도는 Lowry 등(7)의 방법을 변형한 Hartree(7)의 방법에 따라 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 표준 단백질로 사용하여 650nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다.

생 전분의 가수 분해 및 가수 분해 생성물의 확인

인산 완충 용액(0.1M, pH 7.0) 45mL에 쌀, 옥수수 및 감자 전분을 각각 5%(w/v) 농도가 되도록 첨가하고, 여기에 효소액 5mL(0.7IU/mL)를 가하여 50°C에서 진탕시키면서 가수분해 하였다. 이 때, 반응 시간에 따른 생전분의 가수 분해율은 다음의 식에 의하여 구하였다.

$$\text{생 전분의 가수분해율(\%)} = (B/A) \times 100$$

여기서 A는 초기 생전분의 농도, B는 반응후 생성된 환원당의 농도이다

또, 가수분해 하여 생성된 분해산물은 일정 시간 간격으로 취하였으며, Whatman No.1 여지로 다음과 같이 paper chromatography하여 동정하였다. 즉 n-butanol-pyridine-water (6:4:3) 용매계에서 6-7시간씩 3번 반복하여 전개한 후, 풍건하여 alkaline silver nitrate시약에 담구었다가 다시 풍건하였다. 풍건한 여지에 0.5M alcohol성 NaOH를 분무, 발색시켰으며, 이 때, 시약으로 인해 산화된 여지 부분은 5% sodium thiosulfate

용액에 담구어 제거하였다.

호화 전분 가수분해에 따른 blue value의 변화

25%의 호화 전분 용액 8mL에 α-amylase(Sigma, *Bacillus subtilis*, 100units/mg solid), β-amylase(Sigma, sweet potato, crystalline, 980 units/mg protein) 및 정제 효소 용액 2mL(0.7IU/mL)를 넣어 가수분해시키면서 일정 시간 간격으로 취하였으며, 가수분해율에 따른 blue value(%)를 측정하여 호화 전분의 가수분해에 따른 amylase의 작용 특성을 비교, 검토하였다. 이때 가수분해율은 앞에서와 같은 방법으로 구하였고, blue value는 Gilbert 등(8)의 방법에 준하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 가수분해액 0.5mL에 DMSO(Dimethyl Sulfoxide) 5mL를 첨가하여 80°C에 40분 동안 흔들어주면서 가열시켰다. 요오드 용액(0.2% I₂-2% KI) 2mL를 첨가하고 증류수로 100mL가 되게 하여 실온에서 20분 동안 발색시킨후, 650nm에서의 흡광도를 측정하였으며, blue value는 다음 식을 이용하여 구하였다.

$$\text{Blue value} = (A_t/A_0) \times 100$$

여기서 A₀는 초기 가수분해 용액의 흡광도, A_t는 t시간 후 가수분해 용액의 흡광도이다.

효소 반응속도에 미치는 기질 농도의 영향

효소 반응속도에 미치는 기질 농도의 영향은 쌀의 호화 및 생전분 1-25mg/mL에 45mL의 인산 완충용액(0.1M, pH 7.0) 및 효소액 5mL(0.7IU/mL)를 넣어 50°C에서 30분 동안 반응시키면서 초기 반응속도를 측정하여 조사하였다. 이때 효소의 초기 반응 속도는 각 전분 농도에서 50°C로 30분간 반응시키면서 일정시간(5분) 간격으로 시료를 채취하여 생성된 환원당량(mg/mL)을 측정하고, 시간 경과에 생성 환원당 농도의 변화를 도시하고 초기 직선관계의 기울기로부터 구하였으며, 1분당 용액 1mL당 생성된 환원당량(mg/mL/min)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

생 전분의 분해능 및 가수분해 특성

알칼리 내성 *Bacillus* sp의 배양액으로부터 분리한 생전분 분해효소에 의해 쌀의 생전분을 가수분해하고 주사형 전자 현미경으로 표면구조를 관찰하였으며, 그 결과는 Figure 1과 같다.

효소처리하지 않은 대조구의 생전분에서는 일부 다각형을 포함한 불규칙한 타원형의 전형적인 쌀전분 입자 형태를 볼 수 있었다. 일반적으로 쌀의 생전분은 입자 크기가 5μm이며, 입자형상은 1면이 5각형인 구조로서 규칙적으로 배열되어 있다(9). 또 기본적으로는 부드러운나 때때로 톱니 모양(indentation)을 가진 것을 볼 수 있는데, 이것은 쌀전분의 특성으로 전분의 분리시 붙어있던 단백질이 떨어져 나간 것으로 알려지고 있다(9,10). 일반적으로 전분립은 층상구조를 가지며 입자의 내층과 외층에서는 성질의 차이를 나타내어 입자의 내부는 효소작용을 받기 쉽지만 전체 약 20%의 외층은 효소 작용에 대해 저항성을 나타내는데(11), 본 효소의 처리구에서는 입자 표면이 부드러워지면서 표면의 진 부위에 hole을 형성하였다. 이것은 본 효소의 작용으로 전분 입자의 외층이 분해 또는 손상되어 나타나는 것

으로 생전분의 분해능이 있음을 보여주는 결과이다. 이러한 현상은 곡류 발아시의 전분립에서도 널리 보여지는데, 작은 입자의 경우는 전체적으로 균일하게 분해되지만 큰 입자의 경우는 효소분해시 분해를 받기 쉬운 장소가 입자의 적도 부근(equatorial region)이며, 초기에 분해가 많고, 연속적으로 분해를 받는다고 보고되고 있다(11).

한편, Figure 2는 5%(w/v)의 쌀, 옥수수 및 감자 생전분 현탁액 45mL에 본 효소 5mL(0.7IU/mL)를 넣어 50°C에서 반응시키면서 가수분해의 경시변화를 조사한 결과로, 가수분해 시간의

경과에 따라 반응 1-2일째까지는 가수분해율이 급격히 증가하나 그 이후는 서서히 증가하여 거의 최대의 가수분해율 값을 나타내었다. 이는 전분의 산가수분해시에 나타나는 양상과 비슷하며, Kainuma(12)와 Robin 등(13)은 가수분해 초기단계에서는 전분 입자내의 비결정 부분이 급속히 가수분해되고 두 번째 단계에서는 결정 부분의 완만한 분해가 일어난다고 하였다. 최대의 가수분해율 값을 5%(w/v) 쌀, 옥수수 및 감자 생전분에 대해서 각각 40, 25 및 20%로 낮았다. 그러나 이와같이 낮은 가수분해율 값을 기질 농도가 높은 것(5%)에 기인할 수도 있으므로 효소 농도를 동일하게 하여 쌀전분의 농도를 낮추어 실험한 결과에서는 가수분해율의 증가를 보여 Figure 3에서 보는 바와 같이, 0.5% 기질 농도의 경우, 약 81%까지의 높은 가수분해율을 나타내었다. 上田 등(14)에 의하면 액화 및 당화형 amylase에 의한 생전분의 가수분해율은 20% 미만이었으며, 許 등(15)은 *Rhizopus oryzae*로부터의 glucoamylase I 및 II가 옥수수 전분에 대해서 각각 60 및 80%의 분해율을, 그리고 감자 전분에 대해서는 두 효소 모두 50% 미만의 분해율을 나타낸다고 보고하였다. 또 Taniguchi 등(16)도 *Bacillus circulans* F-2의 생전분 분해 효소가 옥수수와 감자 전분에 대해 각각 80 및 40%의 분해율을 보인다고 보고하였다.

한편, 각종 타 효소와 본 효소의 활성을 비교한 결과를 나타낸 Table 1에서 살펴보면, α -amylase, β -amylase 및 glucoamylase의 호화 전분에 대한 효소 활성은 21.66, 29.27 및 26.5 IU/mg protein인 반면, 본 효소의 경우는 86.60 IU/mg protein으로 호화전분에 대해서도 이들보다 매우 높은 효소 활성을 나타내었다. 아울러 전분립의 분해성(raw starch digestivity)을 나타내는 본 정제 효소의 호화 전분 분해능에 대한 생전분 분해능의 비는 32%로, 이 값은 Ishigami 등(17,18)이 보고한 *Rhizopus* 및 *Asp. niger* 효소의 값들 보다는 훨씬 높았고, 특히 호화 전분 분해능에 대한 생전분 분해능의 비가 가장 높은 것으로 알려져 있는 *Charalar paradoxa* 효소의 31.5%와도 비슷한 값이었다. 따라서 본 효소는 호화전분의 약 1/3 속도로 쌀 전분립을 분해함을 알 수 있으며, 효소량을 증가시키거나 이미 보고한 바와 같이 본 효소의 내열성이 매우 높아서 반응최적 온도가 75°C이고, 85°C에서도 80%이상의 활성을 보이며, 특히, pH 9 및 10에서는 80°C까지도 안정성을 나타냄을 고려한다면

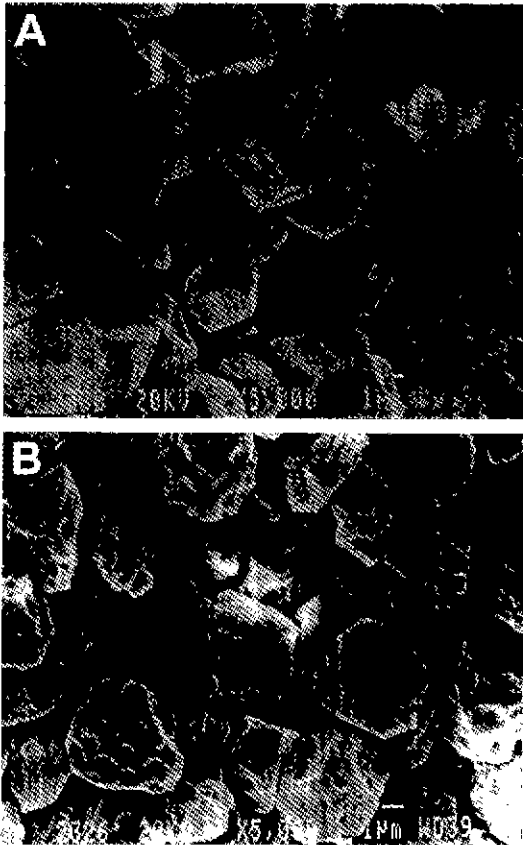


Figure 1. Scanning electron micrographs of native(A) and hydrolyzed(B) rice starches ($\times 5,000$)

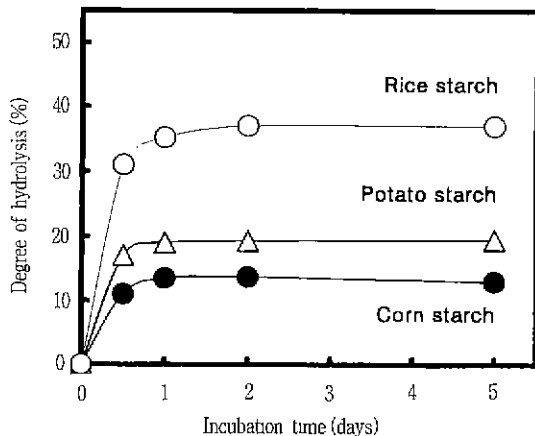


Figure 2 Time course of digestion of various raw starches with the amylase from *Bacillus* sp.

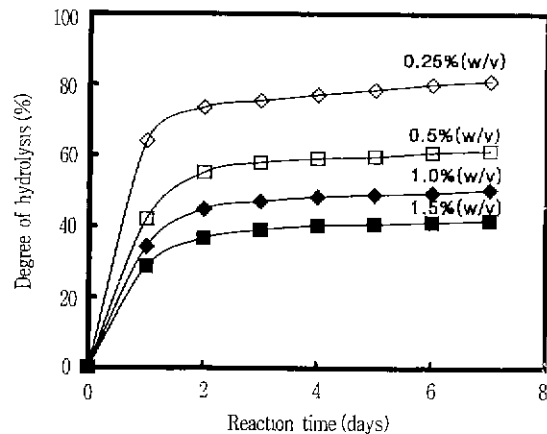


Figure 3. Degree of hydrolysis(%) of rice starch by amylase from *Bacillus* sp. at different starch concentrations.

Table 1. Comparison of the raw and gelatinized starch-digesting activity for various amylases.

Enzyme	Raw starch digesting activity, A(IU/mg protein)	Gelatinized starch digesting activity, B(IU/mg protein)	Ratio (%) ^{a)}	Reference
Purified amylase	28.4	86.60	32.0	Present study
α -Amylase	-	21.66	-	
β -Amylase	-	29.17	-	
Glucocamylase	-	26.50	-	
<i>Charalax paradoxa</i>	13.3	42.40	31.5	(13)
<i>Rhizopus</i> 1	71.0 ^{b)}	675.00 ^{b)}	105	(12)
<i>Rhizopus</i> 2	17.0 ^{b)}	400.00 ^{b)}	42	(12)
<i>Asp.niger</i>	19.0 ^{b)}	570.00 ^{b)}	33	(12)

^{a)}(A/B)×100

^{b)}Activity(amount of glucose released by the enzyme action at 40°C for 15min., μ g)

본 실험의 50°C보다 온도를 효화온도(61°C)이상으로 높혀 반응 시킴으로써 가수분해율을 더욱 크게 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

효소의 작용 양상 및 기질 특성

효소의 작용양상을 살펴보기 위하여 전분의 가수분해율에 따른 blue value의 변화를 조사한 결과는 Figure 4와 같다

그림에서 보는 바와 같이, α -1,4결합을 endo 형으로 절단하는 α -amylase는 random 하게 자르므로 전분이 급속하게 저분자화되어 점도가 감소하였고, 요오드 정색(blue value)이 급속히 소실되었다. 반면, exo형의 β -amylase는 전분의 비환원성 말단으로부터 maltose 단위로 분해하므로 α -amylase의 분해가 극히 초기에 요오드 반응이 급속히 소실하는 것과는 달리 서서히 요오드 반응이 소실됨을 볼 수 있다. 특히, 본 효소는 가수분해 초기에는 exo형의 β -amylase의 작용 양상과 비슷하였으나 가수분해가 30%이상 진행되면 blue value값이 급격히 저하하는 특징을 나타내었다 그러나 생전분 효소의 가수분해 주 생성물은 Figure 5에서 보는 바와 같이, glucose와 maltose이었으며,

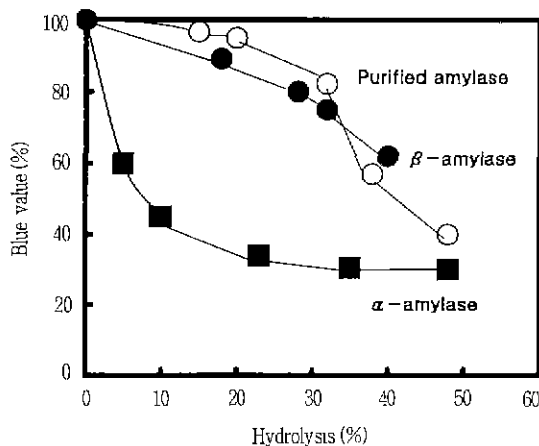


Figure 4. Changes of blue value on hydrolysis(%) of the gelatinized starch during action of various amytases.

일부 올리고당도 검출되었다. 따라서 본 효소는 exo형의 α -amylase(올리고당 생성 α -amylase)로 작용하는 것으로 추정되었다.

한편, 생전분 및 호화전분 기질의 농도(1-25mg/mL)에 효소 용액(0.71IU/mL)을 넣어 50°C로 30분간 반응시키면서 일정시간(5분) 간격으로 시료를 채취하여 생성된 환원당 량을 측정하고, 효소 반응속도(mg/mL/min)를 측정한 다음, 기질 농도에 따른 효소의 초기 반응 속도 변화를 살펴본 결과는 Figure 6과 같다.

그림에서 보는 바와 같이, 호화 및 생전분 모두 기질 농도의 증가에 따라 효소 반응속도도 증가하여 생전분의 경우 약 0.15 mg/mL/min이었고, 호화전분의 경우는 약 0.29 mg/mL/min으로 생전분에 대한 효소의 초기 반응속도는 호화전분의 약 1/2 정도이었다. 또, 효소의 기질 친화력에 대한 보다 정량적인 자료를 얻기 위하여 Figure 6의 자료로부터 1/v과 1/S의 관계를 도출하였으며, 그 결과는 Figure 7과 같다.

그림에서 보는 바와 같이, 호화 및 생전분 모두 1/v과 1/S의 관계는 직선 관계를 보여 Lineweaver-Burk 식(19)에 잘 일치하였다 직선의 관계로부터 산출한 기질 친화력을 나타내는 Km 값은 생전분 및 호화전분에 대하여 각각 4.22 및 3.01 mg/mL 이었고, 최대 반응 속도 Vmax 값은 각각 0.20 및 0.31 mg/mL/min이었다

이 값은 다른 연구자들의 보고된 값 범위로, 김 등(20)은

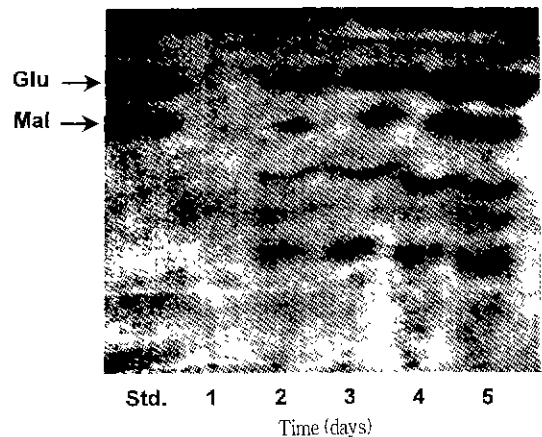


Figure 5 Paper chromatogram of hydrolyzed product

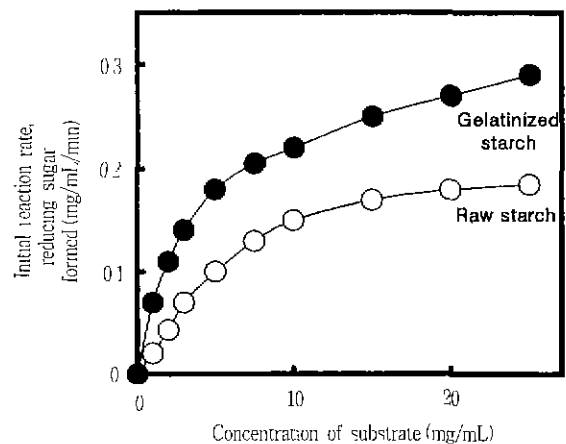


Figure 6. Effect of raw and gelatinized starch on the rate of enzyme catalyzed reaction (Enzyme activity · 0.7 IU/mL).

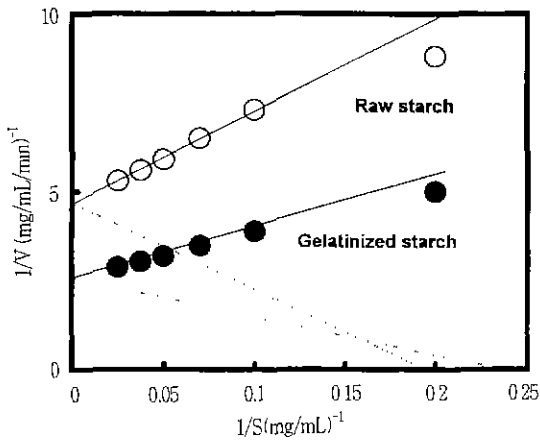


Figure 7. Lineweaver-Burk plot for exo-type amylase action on the raw and gelatinized starch.

Rhizopus oryzae 생전분 분해 효소의 옥수수 생전분에 대한 Km값은 4.802 mg/mL라고 보고 하였고, 손과 박(21)은 *Asp. Oryzae*와 그 변이주의 생전분 당화 효소의 경우, Km 값이 가용성 전분에 대하여 4.545 mg/mL라고 보고하였다.

요 약

생전분 분해 효소의 탐색 연구 일환으로, 알칼리 내성 *Bacillus* sp.가 생산하는 amylase 효소의 생전분 기질에 대한 가수 분해 특성 및 작용 양상을 검토하였다. 정제 효소는 5%(w/v) 쌀, 옥수수 및 감자의 생 전분에 대하여 각각 40, 25 및 25%의 가수분해능을 보였고, 가수분해에 따른 blue value의 변화는 exo형 β-amylase의 작용 양상을 보였다. 그러나 가수 분해 주생성물은 glucose와 maltose이었고, 올리고당도 검출되어서 본 효소는 exo형 α-amylase 계통의 효소로 추정되었다. 정제 효소의 활성은 생 전분 및 호화 전분에 대하여 각각 28.40 및 86.60 IU/mg protem이었고, 호화 전분 분해능에 대한 생전분 분해능의 비(전분립 분해성)는 약 32%이었다. 또 기질 친화력을 나타내는 Km값은 생전분 및 호화 전분에 대하여 각각 4.22 및 3.00 mg/mL이었고, Vmax 값은 각각 0.20 및 0.31 mg/mL/min이었다.

참 고 문 헌

1. T Gallard(1987), *Starch. Properties and Potential*, p. 1, John Wiley & Sons, Ins., Chichester
2. 정만재, 허원영, 정구현, 곽구조(1990), 강력한 생전분 분해 효소의 개발과 특성, *한국산업미생물학회지*, 18, 251-259.
3. 谷口肇(1989), 微生物による 生澱粉の 分解, *醸協*, 84, 518-524.
4. Kainuma, K., H. Ishigami, and S. Kobayashi(1985), Isolation of a Novel Raw Starch-Digesting Amylase from a Strain of Black Mold-*Chalara paradoxa*-, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 32, 136-141.
5. 이신영, 이근익, 김갑수, 조택상(1992), 알칼리 내성 *Bacillus*

- sp.가 생산하는 생전분 분해 효소의 분리 및 최적 배양조건, 강원대학교 과학기술연구, 31, 472-481.
6. 이신영, 조택상, 강태수(1997), 알칼리 내성 *Bacillus* sp.가 생산하는 생전분 분해 효소의 정제 및 특성, *한국생물공학회지*, 12(1), 81-88.
7. Hartree, E.F (1972), Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response, *Anal. Biochem.*, 48, 422-427.
8. G. A. Gilbert and S. P. Spragg(1964), *Method in Carbohydrate Chemistry* (R.L.Whisther, ed.), Vol. 4, p.168, Academic Press. New York
9. De Willigen, A.H.A.(1976): *Examination and Analysis Starch and Starch Products*(J.A. Radley ed.), p.61, Applied Science Publishers Ltd., London.
10. Hayakawa, T., Seo. S.W., and Igaue, I.(1980) Electron Microscopic Observation of Rice Starch. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 27, 173.
11. Kribuchi, S. and Nakamura, M.(1973): Studies on Germination of Baley Seeds (Part 3). Scanning Electron Microscopic Observation of the Starch Granules Isolated from the Germinated Barley. *Denpun Kagaku*, 20, 99-104.
12. Kanuma, K., and French, D.(1971). Nageh Amylodextrin and Its Relationship to Starch Granule. I. Preparation and Properties of Amylodextrin from Various Starch Types *Biopolymers*, 10, 1673.
13. Robin, J.R., Mercier, C., Charbonniere. R., and Guilbot, A.(1974): Lintnerized Starches Gel Filtration and Enzymatic Studies of Insoluble Residues from Prolonged Acid Treatment of Potato Starches. *Cereal Chem.*, 51, 389
14. 上田 誠之助(1979). "アミラーゼ"による 生澱粉分解, *澱粉科学*, 21, 210-221.
15. 허원영, 정만재(1984), *Rhizopus oryzae*로부터 정제한 두가지 형태의 Glucoamylase의 효소적 특성, *한국식품과학회지*, 16, 392-397.
16. Tamguchi, H., M. J. Chung, N. Yoshigi, and Y. Maruyama (1983), Purification of *Bacillus circulans* F-2 Amylase and Its General Properties, *Agric.Biol. Chem.*, 47, 511-519
17. Ishigami, H., H. Hashimoto, and K. Kainuma(1985), Determination of Optimum Culture Condition for the *Chalara* Enzyme Production, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 32, 189-196.
18. Ishigami, H., H. Hashimoto, and K. Kainuma(1985), Purification and Some Properties of the *Chalara* Enzyme. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 32, 197-204.
19. Yoshigi, N, T. Chikano, and M. Kamimura(1985), Purification and Properties of α-Glucosidase II from *Bacillus cereus* NY-14, *J. Jpn Soc Starch Sci.*, 32, 280-286.
20. 김찬조, 오만진, 이종수(1986), *Rhizopus oryzae*에 의한 생전분 분해에 관한 연구, *한국식품과학회지*, 18, 288-293.
21. 손철배, 박윤중(1983), *Aspergillus niger* 및 그 변이주의 생전분 당화 효소에 관한 연구, *충남대 농기연보*, 10, 166-185.