

*Rhizopus oryzae*에 의한 생전분 분해에 관한 연구

- 분리균주에 의한 효소 생산 조건 및 에탄올 발효 -

김찬조 · 오만진 · 이종수

충남대학교 농과대학 식품가공학과
(1985년 8월 1일 수리)

Studies on Digestion of Raw Starch by *Rhizopus oryzae*

- Optimum Condition of Enzyme Production and Ethanol Fermentation -

Chan Jo Kim, Man Jin Oh, Jong Soo Lee

Department of Food Science and Technology, College of
Agriculture, Chungnam National University

(Received August 1, 1985)

A potent mold strain was selected to digest raw starch, which was classified as a strain of *Rhizopus oryzae*. Its amylase production was maximized when grown on wheatbran media for 3 days at 30°C and initial pH 4. The crude enzyme was tested for ethanol fermentation by yeast, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 7026, on various starchy materials and the ethanol production after 4 days was: 9.4% from rice powder, 9% from corn powder, 8.1% from sweet potato powder, and 5.4% from potato powder, respectively.

전분질은 공업원료 특히 주류와 에탄올 생산의 원료로 오래전부터 이용되어 왔으며 현재 대체에너지원의 일환인 에탄올 생산에 섬유질 및 당질과 함께 주목을 받고 있다.

전분질 원료는 보통 증자하여 호화시킨 후 사용하므로 많은 에너지가 소요된다. 그러므로 무증자 전분질의 이용은 그 가공공정이나 에너지 절약면에서 큰 효과를 얻을 것으로 생각된다. 즉 생전분을 그대로 에탄올 발효에 이용할 때 증래에 소요된 총 에너지 (3400~4500 KCal / 에탄올 1 l) 의 약 30%를 절약할 수 있다고 한다⁽¹⁾.

에탄올 생산법으로는 산 당화법⁽²⁾ 및 효소 당화법⁽³⁾ 등 많은 연구가 이루어져 왔으며 무증자 당화법은 현재 에탄올 발효⁽⁴⁻¹³⁾, 주류 제조⁽¹⁴⁻¹⁷⁾, 포도당 제조⁽¹⁸⁾ 등에 그 응용성이 검토되고 일부 실용화가 되어 있다⁽⁴⁾.

생전분 분해효소를 생산하는 미생물로서는 *Aspergillus niger*⁽¹⁹⁾, *Aspergillus cinamomeus*⁽²⁰⁾, *Rhizopus* sp.^(9, 13, 21)와 *Streptococcus bovis*⁽²²⁾, *Cladosporium resinae*⁽²³⁾, *Bacillus circulans*⁽²⁴⁻²⁶⁾ 등이 알려져 있다. 또한 생전분 분해효소의 작용기작에 관한 연구는不破⁽²⁷⁾, Hayasida 등⁽²⁸⁾, Gallant 등⁽²⁹⁾, Leach 등⁽³⁰⁾, 前田 등⁽³¹⁾, 杉木 등⁽³²⁾, 高尾 등⁽³³⁾, Walker 등⁽³⁴⁾의 보고를 볼 수 있고 생전분 분해효소의 특성과 이용에 관하여는 Ueda 등⁽³⁵⁻⁴²⁾, 山崎 등⁽¹⁶⁾의 보고가 있다.

한편 국내에서는 주로 호화전분에 작용하여 액화와 당화를 시키는 각종 amylase에 관한 연구는 많이 이루어져 왔으나 생전분에 작용하는 amylase 및 생전분을 이용한 에탄올 생산에 관한 연구는 배 등⁽⁴³⁻⁴⁴⁾, 손 등⁽⁴⁵⁾ 및 박 등⁽⁴⁶⁾의 기초적인 연구가 발표되어 있을 뿐이다.

필자 등은 토양을 비롯한 자연물에서 생전분 분해력이 강한 미생물을 검색, 분리 선정하여 그의 균학적 성질과 이들이 생성하는 생전분 분해효소의 최적 생산 조건을 검토하였으며 옥수수분과 고구마분 등의 각종 전분질 원료의 가수분해율을 측정하고 아울러 선정된 곰팡이가 생산하는 효소와 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 알코올 발효 실험한 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

재료

쌀 : 대전 근교의 1983년도 산 秋晴,

옥수수 : 부여 2호,

고구마 : 충승 100호,

감자 : 시판품,

옥수수전분과 감자 및 고구마전분 : 일본 Junsei 화학사 제품,

쌀전분 : 분말로 파쇄한 후 제단백하고 침전시켜 얻은 전분을 2~3회 세척하고 건조시켜 사용하였다⁽⁴⁷⁾.

균주의 분리

충남북 일대의 토양 및 부패 고구마, 감자, 메주와 기타 자연물을 분리원으로 하여 Table 1과 같은 분리용 배지에 그의 현탁액을 도말하고 30℃에서 3~5일간 배양한 후 발육되는 곰팡이와 세균 중에서 그 집락 주위에 생전분의 분해환을 형성하는 균과 생전분 배지에서 생육이 양호한 균을 효소 생성 균주로 분리하였다. 또한 본 연구실에서 보관중인 곰팡이 52주와 충북대, 경북대 및 중균협회로부터 분양 받은 곰팡이 38주도 시험균으로 사용하였다.

Table 1. Composition of media for isolation of molds and bacteria.

Molds		Bacteria	
Yeast ext.	2 g	Polypeptone	10 g
NaNO ₃	2 g	Yeast ext.	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g	Starch	10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	K ₂ HPO ₄	3 g
KCl	0.5 g	KH ₂ PO ₄	3 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g	NaCl	1 g
Starch	20 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
D. W.	1,000 ml	D. W.	1,000 ml
(pH 4.5)		(pH 7.0)	

균주의 선정

분리균주의 배양

곰팡이는 100ml 삼각플라스크에 밀기울 10g과 수도수 8ml를 가하고 pH가 4.0이 되도록 조정하여 상법에 따라 살균한 다음 옥수수 전분 2g을 무균적으로 혼합하여 분리균을 접종한 후 30℃에서 3일간 정치배양 하였으며 세균은 표 1의 세균용 배지에 접종하여 30℃에서 2일간 진탕배양 하였다.

조효소액의 조제

곰팡이는 상기 밀기울 배양물에 증류수 50ml를 가하고 실온에서 3시간 침출하여 그 여액을 조효소액으로 하였으며 세균은 상기 2일 배양액의 여액을 조효소액으로 하였다.

효소역가 측정

久留島등⁽²⁰⁾의 방법에 따라 생전분 당화력의 역가를 측정하였다. 즉 100ml 삼각플라스크에 옥수수전분 500mg, 0.1M acetate 완충용액 (pH 4.0) 4ml, 증류수 15ml와 조효소액 1.0ml를 가하여 40℃의 진탕항온 수조에서 60분간 반응시킨 후 0.1N NaOH 10ml를 가하여 반응을 중지시키고 생성된 환원당량을 DNS법⁽⁴⁸⁾으로 측정하였고 효소단위는 반응온도 40℃에서 60분간에 1mg의 포도당을 생성하는 활성을 1 raw starch saccharifying unit (RSU)로 하고 국 1g 또는 효소액 1ml가 나타내는 역가로 표시하였다.

선정균주의 동정

武田⁽⁴⁹⁾와 乾⁽⁵⁰⁾등의 방법에 따라 선정한 7-BU 균주의 형태학적 및 배양학적 특성등을 검토하여 동정하였다.

효소 생산 조건

배지의 수분함량

함수량 12.6%의 밀기울 10g에 옥수수전분 0.1g을 넣고 수도수를 4ml에서 10ml까지 가하고 선정 균주를 30℃에서 3일간 배양한 후 그 역가를 측정, 비교하여 효소생산의 최적 가수량을 검토하였다.

pH 및 온도

밀기울 10g에 옥수수전분 0.1g과 수도수 8ml를 가한 배지 (이하 기본배지로 함)의 pH를 2.5~6.0까지 0.5간격으로 조절한 후 선정균주를 전과 같이 배양하고 역가를 측정, 비교하여 최적 pH를 검토하였으며 pH를 4.0으로 조절한 밀기울 기본배지에 선정균주를 접종하고 25℃에서 40℃까지 5℃간격으로 3일간 배양하여 효소역가를 측정, 비교하므로써 최적 온도를 검정하였다.

배양시간

밀기울 기본배지에 기정균주를 접종하여 30℃에서 24시간에서 120시간까지 12시간 간격으로 각각 배양한 후 효소역가를 측정, 비교하여 효소생산의 최적 배양 시간을 검토하였다.

탄소원

옥수수전분을 제외한 밀기울 기본배지에 ribose, glucose, fructose, maltose, raffinose 및 corn starch 등 각종 탄소원을 0.5%씩 첨가하여 전과 같이 배양한 후 그 효소역가를 측정, 비교하고 가장 효과적인 탄소원으로 인정된 옥수수전분을 0.25%에서 2.0%까지 일정한 농도로 첨가하고 그 역가를 측정, 비교하여 최적 탄소원의 농도를 검토하였다.

질소원

밀기울에 옥수수전분 0.5%를 첨가한 후 (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, NH₄Cl, NaNO₃, urea 및 peptone 등을 각 0.1%씩 첨가하여 선정균주를 전과 같이 배양한 후 효소역가를 측정하여 질소원의 첨가효과를 검토하였다.

전분의 가수분해율

1/20 M acetate 완충용액 (pH 4.0) 30 ml에 쌀전분, 옥수수전분, 감자전분 및 고구마전분과 풍건하여 40메쉬의 분말로 한 쌀가루, 옥수수가루, 감자가루, 고구마가루 등을 전분가로 20%가 되도록 가하고 조효소액 (0.73 U/ml) 5ml를 가하여 40℃에서 반응시간에 따른 가수분해율을 측정하였다.

전분 농도에 따른 가수분해율

1/20 M acetate 완충용액 (pH 4.0) 30 ml에 3ml의 조효소액 (0.74 U/ml)을 가하고 생전분을 1%에서 10%까지 일정농도로 가하여 40℃에서 2일 반응시킨 후 가수분해율을 측정하였다.

생목수수전분 및 증자옥수수전분의 가수분해율

1/20 M acetate 완충용액 (pH 4.0) 5 ml에 증류수 4 ml와 옥수수전분 500 mg을 가하고 100℃에서 10분간 처리하여 호화시킨 것과 호화시키지 않은 것 9 ml에 조효소액 (0.74 U/ml) 1 ml를 가하여 40℃에서 반응시키면서 경시적으로 가수분해율을 측정하였다.

알코올 발효실험

수도수 30 ml에 쌀가루, 옥수수가루, 감자가루 및 고구마가루 등을 전분가로 20%가 되도록 가하고 조효소액 (0.73 U/ml) 5 ml와 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 7026을 접종하여 30℃에서 발효시키면서 pH와 산도는 상법에 따라 측정하고 알코올은 Shimazu GC-4 BM gas chromatograph로 propyl

Table 2. Operating conditions of gas chromatography.

Model	Shimazu GC-4BM
Packing material	Porapak Q
Detector	Flame ionization detector
Column temp.	125℃
Detector temp.	150℃
Carrier gas	45 ml/min. N ₂ gas
Sensitivity	10 ² range
Sample size	2 μl

alcohol를 내부표준 물질로 하여 정량하였다. gas chromatography의 분석조건은 Table 2와 같다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

균 분리용 기본배지를 이용하여 생전분 분해효소 생산능이 있다고 판단되는 409주의 곰팡이와 62주의 세균 및 2주의 방선균을 분리하였다. 이들 중 부엽토양에서 분리한 곰팡이인 7-BU 균주가 효소

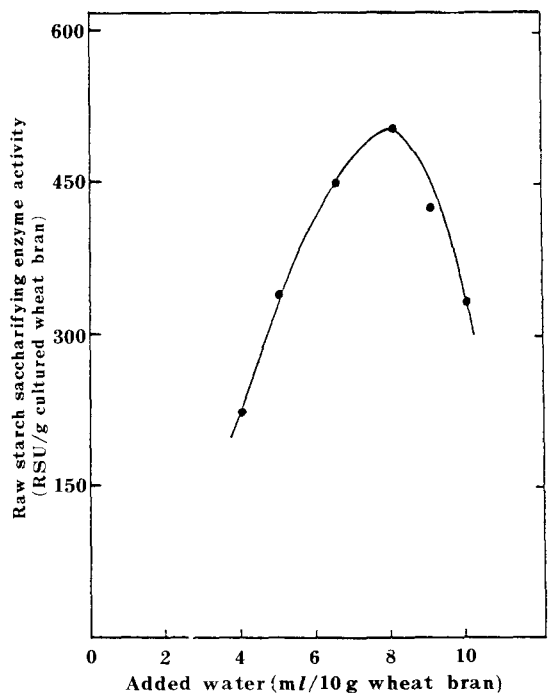


Fig. 1. Effect of amount of water added on the production of raw starch saccharifying enzyme.

생산능이 가장 강하였으므로 이하의 실험에서는 이 균주를 사용하였다. 선정된 7-BU 균주의 형태학적 특성을 pH 4.5의 Czapek-Dox 배지에서 2일간 배양하여 검토한 결과 포복지와 가균을 형성하고 포자낭층은 잘 발달하였으며 포자낭은 흑색의 구형 내지 타원형이었고 크기는 직경이 80~100 μ 이었다. 또한 oryzanine을 첨가한 Peffer 배지에서의 생육은 37°C에서는 좋았으며 45°C에서는 생육하지 않았다. 후막포자를 잘 형성하였고 inulin을 발효하였으며 젖산을 생성하였다. 또한 감자배지에서는 41°C에서 포자를 형성하며 생육 적온이 32-33°C 인 점 등으로 미루어 *Rhizopus oryzae*로 동정되었다.

효소 생산 조건

수분함량

밀기울 배양시 최적 수분함량은 Fig. 1에서와 같이 밀기울 배지 10g에 8ml의 수도수를 가하였을 때 효소역가가 제일 높았다. 밀기울 자체의 수분함량이 12.6%이었으므로 약 60%의 함수량이 효소생

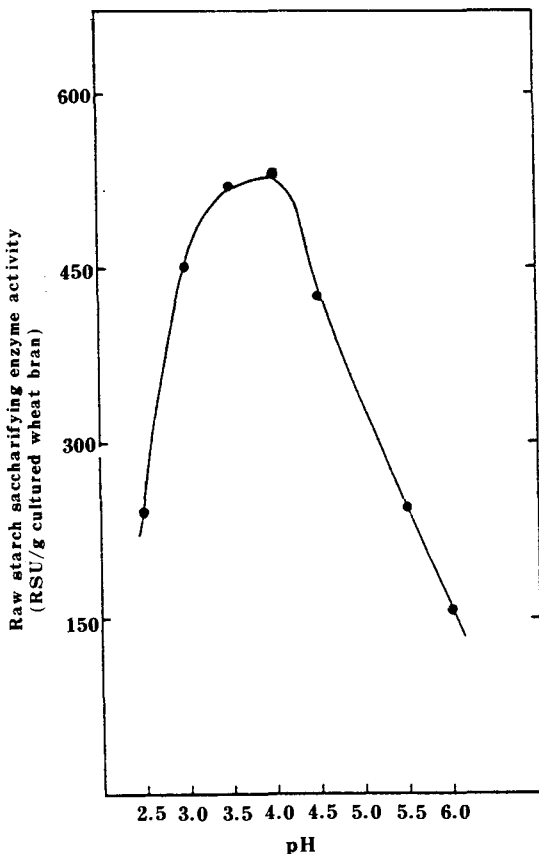


Fig. 2. Effect of pH of the media on the production of raw starch saccharifying enzyme.

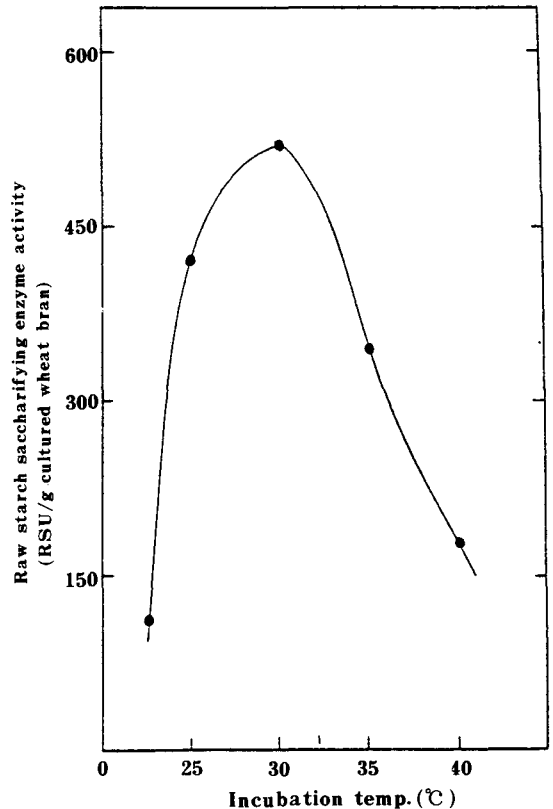


Fig. 3. Effect of temperature on the production of raw starch saccharifying enzyme.

산에 적합한 것으로 생각된다.

pH 및 온도

효소생산 최적 pH는 Fig. 2에서와 같이 약 3.5~4.0이었으며 pH 5.0보다는 3.0에서 더 높은 효소역가를 보였다.

또한 효소생산 최적온도는 Fig. 3에서와 같이 30°C이었다. 이는 손등⁽⁴⁵⁾이 *Aspergillus niger*와 변이주의 생전분 당화 효소생산 최적온도가 30°C이었다는 보고와 같은 결과이다.

배양시간

효소생산 최적 배양시간을 검토한 결과 Fig. 4에서와 같이 최적 배양 일수는 3일이었다. 이는 손등⁽⁴⁵⁾의 *Aspergillus niger*와 변이주에 대한 실험결과와 거의 유사하였다.

탄소원

밀기울 배양시 각종 탄소원의 첨가 효과는 Fig. 5에서와 같이 각 탄소원의 첨가로 대조구보다 효소생산 및 균체의 생육이 양호하였으며 특히 옥수수생전분의 첨가효과가 컸다. 한편 溝上⁽²²⁾ 등은

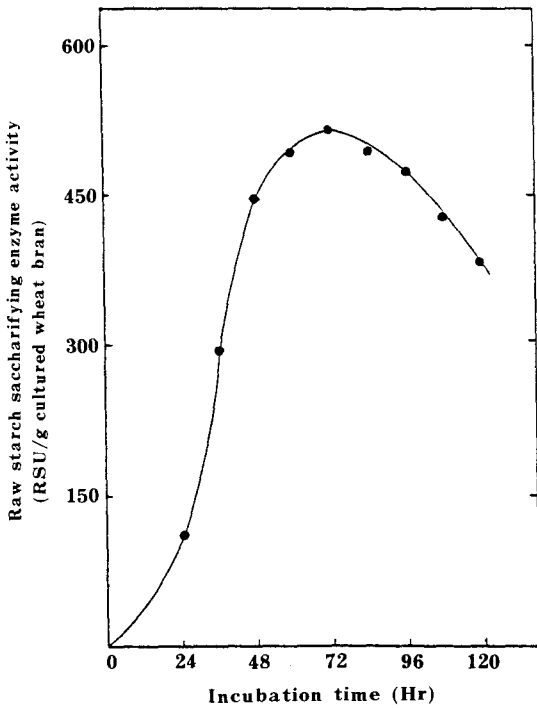


Fig. 4. Effect of incubation time on the production of raw starch saccharifying enzyme.

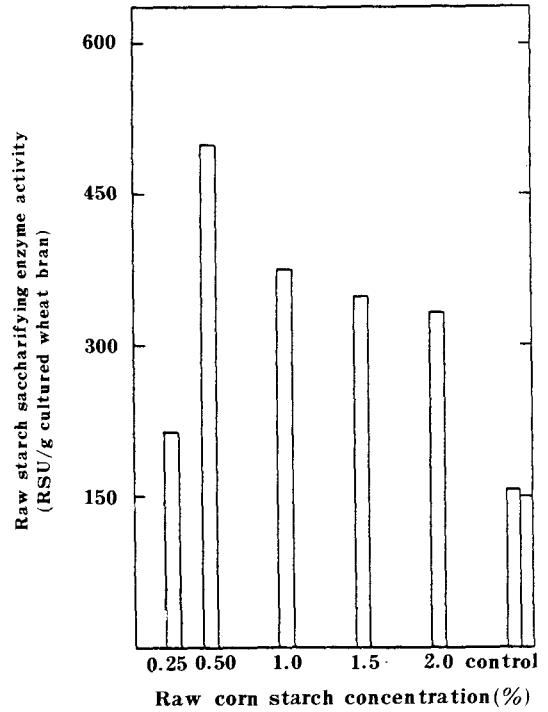


Fig. 6. Effect of corn starch concentration on the production of raw starch saccharifying enzyme.

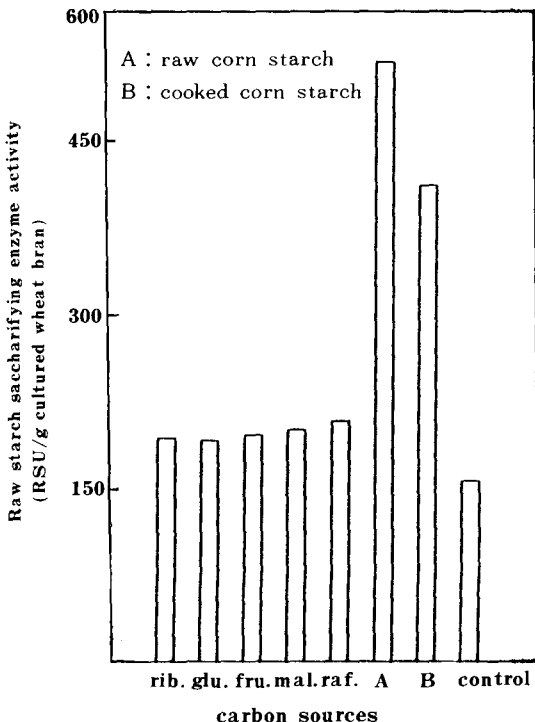


Fig. 5. Effect of carbon sources on the production of raw starch saccharifying enzyme.

*Streptococcus bovis*의 생전분 당화효소 생산시 가용성 전분의 첨가효과가 가장 좋았다고 발표한 바 있다.

한편 효소생산시 탄소원으로 가장 효과가 좋은 옥수수 생전분의 첨가농도를 검토한 결과 Fig. 6에서와 같이 0.5%의 농도에서 가장 양호하였다.

질소원

밀기울 배양시 각종 질소원의 첨가 효과는 Fig. 7에서와 같이 유기태 질소의 첨가로 생육은 양호하였으나 오히려 효소생산을 감소시켰으며 무기태 질소의 첨가구에서도 효과는 인정되지 않았다.

생전분의 가수분해율

쌀, 옥수수, 감자 및 고구마 등 각종 생전분의 반응시간에 따른 가수분해율은 Fig. 8에서와 같이 쌀전분과 옥수수전분의 가수분해율이 제일 높았으며 고구마, 감자전분의 순이었다. 이는 Ueda 등⁽¹⁵⁾과 손등⁽⁴⁵⁾의 흑곡균의 생전분 당화효소를 이용한 각종 생전분의 가수분해율과 거의 같은 경향이였다. 생전분 분해 및 발효에 미치는 중요 인자로는 효소제의 종류^(51, 52)와 원료전분의 종류⁽⁵³⁾등이 알려져 있으며 본 실험에서도 감자전분이 타 전분에 비하여

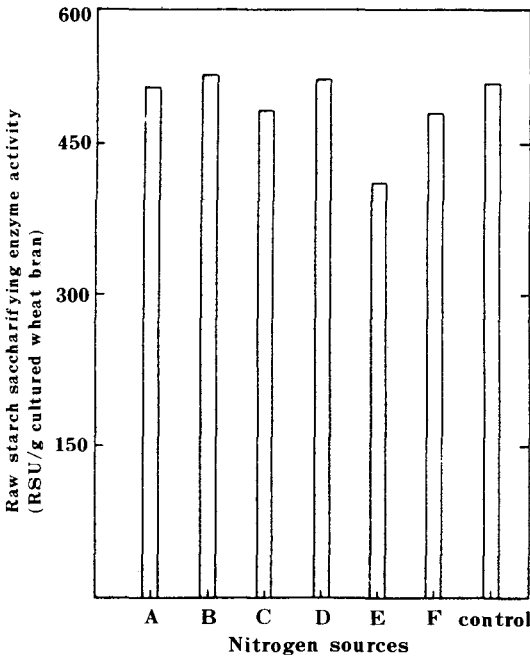


Fig. 7. Effect of nitrogen sources on the production of raw starch saccharifying enzyme.

- A : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ D : NaNO_3
- B : NH_4Cl E : urea
- C : NH_4NO_3 F : peptone

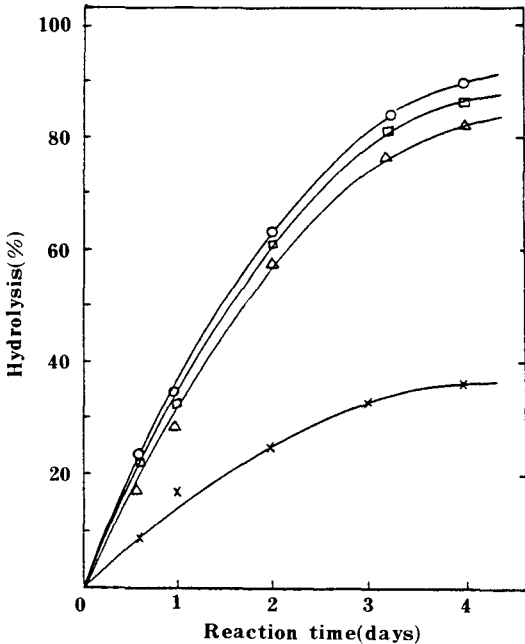


Fig. 8. Hydrolysis of various raw starch by crude enzyme. —○— : rice starch —□— : corn starch —△— : sweet potato starch —×— : potato starch

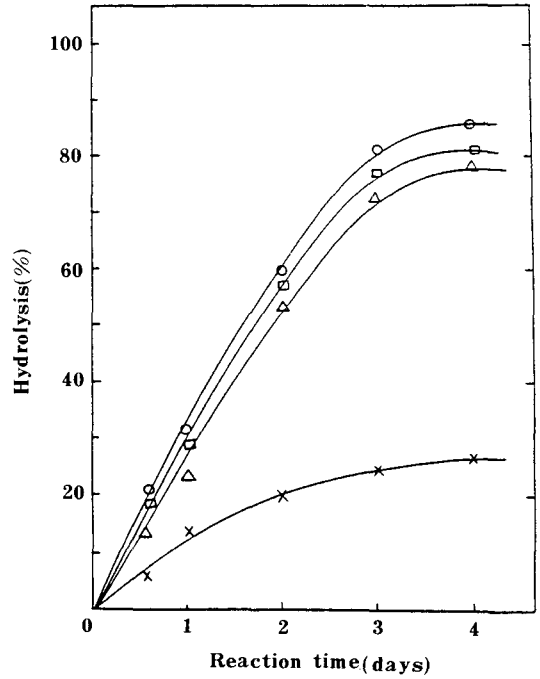


Fig. 9. Hydrolysis of cereal powders by crude enzyme. —○— : rice powder —□— : corn powder —×— : potato powder —△— : sweet potato powder

가수분해율이 현저히 낮은 것은 전분의 구조적인 차이에 기인되는 것으로 사료된다.

전분질 원료의 가수분해율

쌀, 옥수수, 감자 및 고구마 등을 풍건하여 분말로 한 각종 전분질 원료의 반응시간에 따른 가수분해율을 측정된 결과 Fig. 9에서와 같이 각종 생전분의 가수분해율보다 2~5% 정도 떨어지는 경향이였다.

전분농도에 따른 가수분해율

쌀전분, 옥수수전분, 감자전분 및 고구마전분의 각 농도에 따른 가수분해율은 Fig. 10에서와 같이 1%에서 가장 높았으며 10% 농도로 높아짐에 따라 실제 생성된 절대 환원당량은 올라가는 경향이 있으나 분해율은 떨어졌다.

생옥수수전분 및 증자옥수수전분의 가수분해율

에탄올 생산에 적합한 것으로 생각되는 원료 중의 하나인 옥수수 생전분과 옥수수 호화전분의 반응시간에 따른 가수분해율은 Fig. 11에서와 같이 반응 4일 후에 약 80~82%로서 생전분과 호화전분간에 큰 차이를 보이지 않았다. 한편 배⁽⁴³⁾ 등은 *Aspergillus shirousami* 27의 glucoamylase에 의하

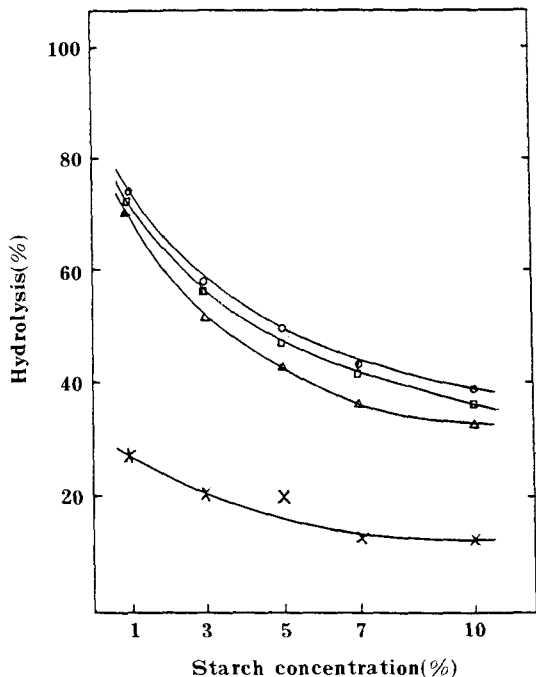


Fig. 10. Effect of raw starch concentration on the hydrolysis of various starch.

—○— : rice starch —□— : corn starch
 —△— : sweet potato starch —×— : potato starch

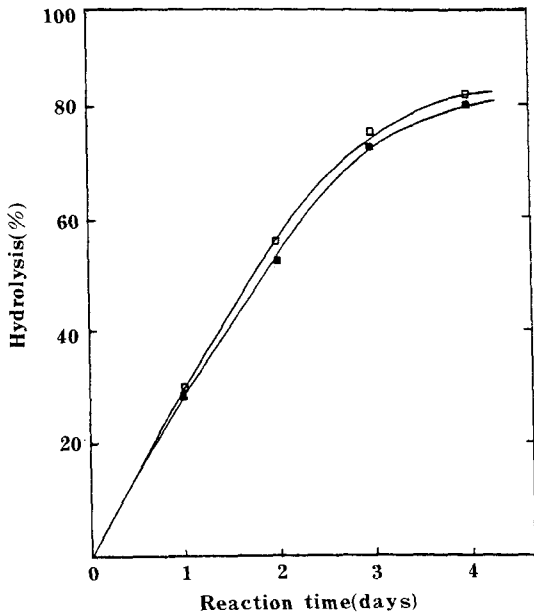


Fig. 11. Hydrolysis of raw corn starch and cooked corn starch by crude enzyme.

—□— : cooked corn starch
 —■— : raw corn starch

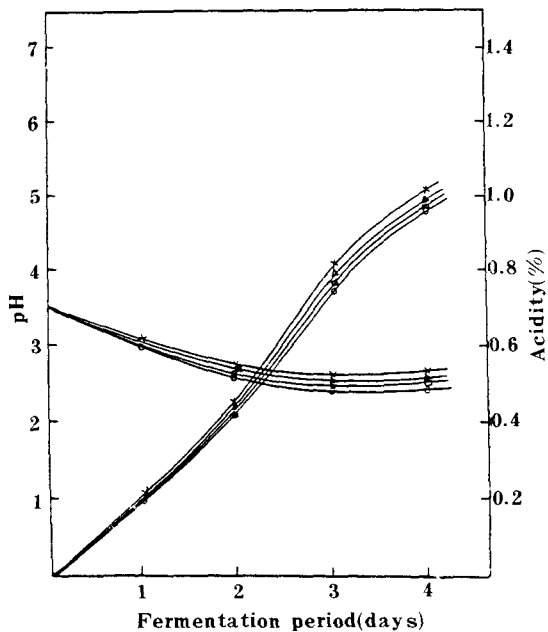


Fig. 12. Changes of pH and acidity during the alcohol fermentation on cereal powders.

—○— : rice powder —□— : corn powder
 —△— : sweet potato powder
 —×— : potato powder

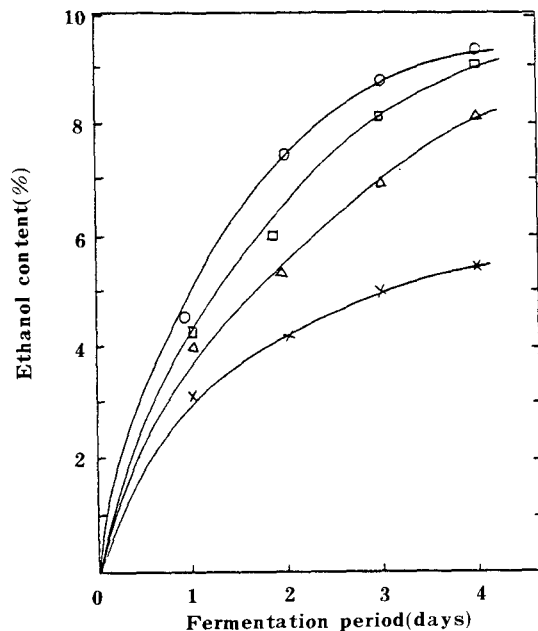


Fig. 13. Changes of ethanol content during the alcohol fermentation on cereal powders.

—○— : rice powder —□— : corn powder
 —△— : sweet potato powder
 —×— : potato powder

여 카사바 전분을 당화할 때 생전분에 비하여 호화시킨 전분의 당화율이 훨씬 높다고 보고한 바 있다.

알코올 발효실험

옥수수가루등 각종 전분질 원료의 알코올 발효 실험을 실시한 결과 Fig. 12와 13에서와 같이 담금 중의 pH는 저하되었고 담금 4일 후 1% 내외의 산 생성을 보였다. 또한 에탄올 함량은 담금 4일 후 쌀가루 9.4%, 옥수수가루 9.0%, 고구마가루 8.1% 및 감자가루 5.4%의 에탄올 생성을 보였고 이들 량은 생전분에 대하여 약 80~93%의 수율에 해당되었다. 한편 박등⁽⁴⁶⁾은 각종 증자 및 무증자전분의 에탄올 생산 실험에서 쌀전분과 고구마 전분에서는 그 생성량이 비슷하였으나 옥수수전분과 감자전분에서는 무증자전분의 에탄올 생성량이 증자전분에 비해 다소 떨어졌다고 보고한 바 있다.

요 약

토양등으로부터 생전분 분해효소 생산능이 있는 409주의 곰팡이와 62주의 세균 및 2주의 방선균을 분리하고 이들 중에서 7-BU 균주를 선정하여 동정하고 밀기울을 기본배지로 한 효소 생산조건 및 생전분을 이용한 알코올 발효 실험 등을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생전분 분해효소 생산능이 강하다고 인정된 7-BU 균주는 *Rhizopus oryzae* 로 동정되었다.

2. 7-BU 균주의 효소생산 최적온도는 30°C 이고 pH는 4.0이었으며 배양 72시간 후에 최고의 역가를 보였고 밀기울 배지에 옥수수전분을 0.5% 첨가하였을 때 효소생산이 더욱 촉진되었다.

3. 조효소액에 의한 각종 생전분의 가수분해율은 반응 4일에 쌀전분 89.2%, 옥수수전분 85%, 고구마전분 82%, 감자전분 36% 이었고 쌀가루는 86%, 옥수수가루 81%, 고구마가루 79%, 감자가루 30% 이었다.

4. 옥수수가루, 쌀가루, 고구마가루와 감자가루를 원료로 하여 조효소액과 효모를 첨가한 후 알코올 발효 실험을 한 결과 담금 4일 후 쌀가루 9.4%, 옥수수가루 9.0%, 고구마가루 8.1%, 감자가루 5.4%의 에탄올 생성을 보였다.

사 사

본 연구는 한국과학 재단의 연구비 지원으로 수행되었으며 재단 당국에 깊은 감사사를 드립니다.

참고문헌

1. 山本 武彦, 化学工学: 45(5), 285-290 (1981).
2. De Menezes, T. J. B.: *Process Biochem.* 13(9), 24 (1978)
3. Azhar, A., M. K. Hamdy: *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1297 (1981).
4. Chotickai, P. and S. Ueda: *Ann. Rep. of ICME.* 230-237 (1980).
5. Kamihara, T., V. Vangsuvarlert and J. Kumnunta: *Ann. Rep. of ICME.* 359-363 (1978).
6. Olympia, M. S. D. and S. Ueda: *Ann. Rep. of ICME.* 95-105. (1980).
7. Poonsaran, N. and K. Nojiri: *Ann. Rep. of ICME.* 359-363. (1980).
8. Sivipitayangoorn, S. and S. Ueda: *Ann. Rep. of ICME.* 370-372. (1981).
9. Svendsby, O., T. Yamamoto, K. Katutani, Y. Matsumura and M. Iizuka: *J. Ferment. Technol.* 59, 485-487. (1981).
10. Thammarufwasik, P., Y. Fujio and S. Ueda: *Ann. Rep. of ICME.* 346 (1978).
11. Ueda, S. and Y. Koba: *J. Ferment. Technol.* 58 (3), 237-241. (1980).
12. Ueda, S., C. T. Zenin, D. A. Monteiro and Y. K. Park: *Biotechnol. Bioeng.* 23, 291-299 (1981).
13. 吉栖 肇, 松元 信也, 福田 修, 福士 收: 日本特許公開, 57-102189 (1982).
14. 態谷 知榮子, 鈴木 逸郎, 黄 正財, 宮入 正法, 田中 利雄, 秋山 裕一: 日醸協誌, 60, 77-86 (1982).
15. 上田誠之助, 古賀偉郎: 日醸協誌, 21, 133-135 (1965).
16. 山崎何恵, 上田誠之助, 島田豊明: 日醸協誌, 21, 83-86 (1963).
17. 吉栖 肇, 松本 信也, 福士 收, 日特許公報: 56-46831 (1981).
18. 福本 壽一郎, 辻波 好夫, 岡田 茂孝, 日特許公報: 40-7111 (1965).
19. 上田 誠之助, 澱粉科学: 25(2), 124-131 (1978).
20. 久留島 通俊, 佐藤 淳司, 北原 賞雄: 日農化誌, 48(6), 379-384 (1974).
21. 西 帷義: *Amylase Symposium*, 33-38 (1963).
22. 溝上恭平, 小崎 道雄, 北原 賞雄: 澱粉科学, 25, 124 (1978).

23. Marshall, J. J.: *United States Patent*, **4**, 318, 989 (1982).
24. 정만재, 谷口 肇, 丸山 芳治: 산업미생물학회지, **9**(4), 185-190 (1981).
25. 정만재, 谷口 肇, 丸山 芳治, 이미자: 산업미생물학회지, **10**(2), 123-132 (1982).
26. Taniguchi, H., F. Odashima, M. Igarashi, Y. Maruyama and M. Nakamura: *Agric. Biol. Chem.* **46**(8), 2107-2115 (1982).
27. 不破 英次, 杉本 温美, 高谷 友久: 澱粉科学, **26**(3), 105-111 (1979).
28. Hayashida, S., S. Kunisaki, M. Nakao and P. Q. Flor: *Agric. Biol. Chem.* **46**(1), 83-89 (1982).
29. Gallant, P. D., A. Derrien, A. Aumaitre and A. Guilbot: *Die Starke*. **25**, 56-64. (1973).
30. Leach, H. W. and T. T. Schoch.: *Cereal Chem.* **38**, 34-46 (1961).
31. 前田 巖, 自見 信子, 谷口 肇, 中村 道德: 澱粉科学, **26**(2), 117-127 (1979).
32. 杉本 温美, 大西 恵子, 高谷 友久, 不破 英次: 澱粉科学, **26**(3), 182-190 (1979).
33. 高尾 文子, 杉本 温美, 不破 英次, 澱粉科学: **25**(1), 12-18 (1978).
34. Walker, G. J. and P. M. Hope: *Biochem. J.* **86**, 452-462 (1963).
35. Ueda, S. Bull: *Agric. Chem. Soc.*, **20**(3), 148-154 (1956).
36. Ueda, S. Bull: *Agric. Chem. Soc.* **21**(5), 284-290 (1957).
37. 上田 誠之助: 日農化誌, **31**(12), 898-902 (1957).
38. 上田 誠之助: 日農化誌, **31**(12), 902-904 (1957).
39. 上田 誠之助: 日農化誌, **32**(8), 648-650 (1958).
40. Ueda, S.: Mechanism of saccharide polymerization and depolymerization (J. J. Marshall, ed.) Academic Press, New York, (1980).
41. Ueda, S., R. Ohba and S. Kano: *Die Stärke*. **26**, 374-378 (1974).
42. Ueda, S. and R. Ohba: *Die Stärke*. **28**, 20-22-22 (1976).
43. 배무, 이재문: 한국산업미생물학회지, **11**(3), 181-185 (1983).
44. 배무, 이재문: 한국산업미생물학회지, **12**(4), 261-264 (1984).
45. 손천배, 박윤중: 충남대 농기연보, **10**(1), 166-185 (1983).
46. 박관화, 오병하, 홍승서, 이계호: 농화학회지, **27**(3): 198-203 (1984).
47. 김재욱: 농산식품가공, 152-154, 문운당, (1971).
48. M. Pesez and J. Bartos.: Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compound and Drugs. Marcel Dekker. New York 407 (1974).
49. 武田: 日農化誌, **11**, 845 (1925).
50. Inui, T., Y. Takeda and H. Iizuka.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **11**, Suppl. (1966).
51. Saha, B. C. and S. Ueda: *J. Ferment. Technol.* **61**, 67 (1983).
52. Ueda, S. and B. C. Saha: *Die Stärke*. **32**, 420 (1980).
53. 不破 英次: 澱粉科学, **29**, 99 (1982).