

Aspergillus niger 유래의 Transglucosidase의 고정화

안장우 · 박관화* · 서진호*

청강문화산업전문대학 식품공업과,

*서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재연구센터

Immobilization of Transglucosidase from *Aspergillus niger*

Jang-Woo Ahn, Kwan-Wha Park* and Jin-Ho Seo*

Department of Food Science and Technology, Chungkang College of Cultural Industries

*Department of Food Science and Technology and Research Center for

New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University

Abstract

Transglucosidase (TG) from *Aspergillus niger* was immobilized on various carriers by several immobilization methods such as ionic binding, adsorption, entrapment, covalent linkage and metal chelation to improve the process performance. The covalent linkage with CNBr-activated sepharose 4B was found as the best method for immobilization of TG based on the immobilization yield which was 61.3%. The immobilization through ionic binding and adsorption gave 33.1% and 22.5% yield respectively but both methods were not selected due to lower yield than covalent linkage using CNBr-Sepharose 4B. Internal diffusion resistance in beads developed by entrapment were not suitable factor in producing final target products. Covalent linkage of TG on magnesium silicate, silica gel and glass bead and metal chelation method didn't result in higher yield than the selected one, either.

Key words: transglucosidase, isomaltooligosaccharides, immobilization

서 론

Transglucosidase (TG)는 maltose를 기질로 하여 이소말토올리고당을 생산하는 효소이다. 이소말토올리고당은 α -(1→6)-glucosidic linkage를 가지고 있는 isomaltose, panose, isomaltotriose 등을 주성분으로 한다. 이소말토올리고당은 효모에 의해 발효되지 않는 비발효성 당으로서 여러 식품에 존재하며^(1,2), 인체에 유익한 생리적 특성을 보인다고 알려져 있다^(4,5). 또 식품가공적성도 좋아 식품에 광범위한 응용이 가능하다고 알려지면서^(4,5) 식품신소재로서 소비도 계속 늘어나고 있는 추세이다⁽⁶⁾. 그러나, 현재 산업적으로 생산되는 이소말토올리고당은 회분식 공정으로 생산되고 있으므로 효소의 비용이나 생산성이 낮은 것이 문제로 지적되고 있다. 이러한 문제점을 개선하기 위한 방법의

일환으로 고정화 효소를 개발하고 연속적인 공정을 도입하게 되면 비용절감 및 생산성 향상 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

올리고당 생산에 관여하는 효소의 고정화와 관련된 연구를 보면 Yoshida가 exo-maltotetrahydrolase의 고정화에 대해⁽⁷⁾, Mohamed⁽⁸⁾가 물리적 결합, 이온 결합, 공유결합을 이용한 효소고정화를 실시하였고 그 결과, 고정화 효소의 최적온도가 모두 10°C 이상 상승하였음을 보고하였다. Kimura⁽⁹⁾는 *Pseudomonas stutzeri* 유래의 amylase를 고정화하여 maltotetraose를 생산했다고 보고하였다. Ravet 등⁽²⁰⁾은 고정화 β -glucosidase를 이용한 gluco-oligosaccharide의 합성 반응에서 가용성 효소보다 5배 이상 더 효과적임을 보고하였다. Xylosyloligosaccharide도 *Aspergillus niger* 유래의 β -xylosidase를 이용한 transxylosylation 반응을 통해 합성이 가능하였다고 보고되었다⁽²¹⁾. 한편 이온결합에 의해 β -fructofuranosidase를 고정화시켜 fructooligosaccharide를 생산하였다는 보고도 있으며⁽²²⁾ calcium alginate를 이용한 entrapment 방법으로 β -fructofuranosidase를 고

Corresponding author: Jin-Ho Seo, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Seodoo-dong, Kwun-sungu, Suwon, Kyunggi-do 441-744, Korea

정화시킨 후 fructooligosaccharides를 생산하였다는 결과도 보고된 바가 있는데⁽²³⁾ 반감기가 275일인 고정화된 β -fructofuranosidase를 이용하여 장기간 연속공정이 가능해졌음을 보고하였다.

본 연구에서는 앞서 보고된 *Aspergillus niger* 유래의 TG의 이소말토올리고당의 생성반응 특성⁽²⁴⁾에 이어 효소의 비용절감과 공정개선을 위해 TG의 고정화를 위한 여러가지 방법을 비교하고 고정화 방법을 선정하고자 하였다.

재료 및 방법

효소용액

본 실험에서 사용한 TG는 *Aspergillus niger*에서 유래한 효소이다. 이소말토올리고당을 생산하기 위해 (주)삼양제넥스에서 사용하고 있는 "Transglucosidase Amano L" (효소의 역가는 350 unit/mL)을 액상으로 공급받아 사용하였다.

고정화용 담체

Amberlite IR-120과 IRA-400은 Fluka사, Diaion HP-20은 Mitsubishi Kasei사, Amberlite CG-50, IRA-900, QAE-cellulose [diacetyl-(2-hydroxy propyl) aminoethyl cellulose], DEAE-sephadex, 키토산, sodium alginate와 CNBr-activated sepharose 4B는 Sigma Chemical사 제품을 사용하였다.

TG의 활성 측정 방법과 고정화 수율

TG의 활성측정 방법은 전보⁽²⁴⁾와 같은 방법으로 측정하였다. 효소의 1 unit는 40°C, pH 5.0에서 1분에 1 μ mole의 panose를 생성시키는 효소의 양으로 결정하였다. 고정화 TG의 활성측정방법은 가용성 TG의 그것과 동일하나 고정화 TG의 무게를 측정된 후 첨가하여 반응시켰다. 효소반응에 의해 생성된 panose와 그 밖의 반응산물의 농도는 ion chromatography로부터 얻은 chromatogram을 이용하여 분석하였다. Ion chromatography의 분석조건과 정량은 참고문헌⁽²⁵⁾에 자세히 나와 있다. 고정화 수율(%)은 (고정화 TG의 활성/고정화에 사용된 가용성 TG의 활성) $\times 100$ (%)로 정하였다.

이온교환수지 및 흡착제의 전처리

TG를 고정화시키기 전에 우선 담체가 TG의 고정화를 위해 알맞은 상태가 되도록 하기 위해 다음과 같이 전처리를 하였다.

Amberlite류: 담체를 충분한 양의 증류수에 넣어 유리막대로 저어주면서 팽윤시킨 후 정치시켰다가 상등액과 함께 입자가 작은 담체나 기타 부유물, 불순물 등을 제거하였다. 이런 세척과정을 3번 반복한 후에 90°C에서 건조시켜 수분을 제거하였다. 건조된 담체를 2 N NaOH로 세척한 후에 증류수로 NaOH를 제거하였다. 담체를 Whatman filter paper (No. 4)로 여과한 후에 이번에는 2 N HCl로 세척하고 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)로 HCl을 제거하고 다시 동일한 filter paper로 여과한 후 같은 buffer에 suspension시켜 4°C에 보관하였다.

QAE-cellulose: QAE-cellulose를 1 N NaOH 용액에 넣고 유리막대로 저어준 후에 증류수로 담체를 세척하면서 NaOH를 제거하였다. 이번에는 1 N HCl을 이용하여 담체를 세척해 준 후 다시 증류수로 세척하여 HCl이 남아있지 않도록 하였다. 이 과정 후에 1 N NaOH 처리와 증류수 세척을 거치고 최종적으로 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)로 세척한 후 같은 buffer로 옮겨 4°C에 보관하였다.

Diaion HP 20: Diaion HP 20을 충분한 양의 2 M NaOH에 넣어 1차 세척한 후 정치시켰다가 NaOH 용액을 따라버리고 2 M HCl 용액을 부은 후 유리막대로 저어주었다. HCl 용액을 역시 제거한 후에 에탄올을 부어 세척하고 최종적으로 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0)로 에탄올을 씻어 제거한 뒤 같은 buffer에 옮겨 4°C에 보관하였다.

이온결합이나 흡착을 통한 고정화 방법

전처리가 된 후에 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0)에 담겨 있던 담체를 Whatman filter paper (No. 4)로 1차 여과하고 같은 여과지로 옮겨 남은 수분을 제거한 후 담체 0.5 g을 15 mL 시험관에 넣고 buffer 2.75 mL를 넣은 후 효소용액 0.25 mL를 추가로 넣은 뒤 상온에서 30분간 부드럽게 교반시키며 효소를 고정화시켰다. 고정화되지 않은 TG를 세척액에서 단백질이 존재하지 않을 때까지 buffer로 충분히 세척하였고 고정화된 TG는 buffer에 넣어 4°C에 보관하였다.

Entrapment

Sodium alginate를 auto homomixer를 이용하여 2500~4000 rpm의 조건에서 물에 녹여 4%, 7%, 10% (w/v) 용액으로 제조하였다. 각 농도의 sodium alginate 용액 4.5 mL에 효소용액 0.5 mL와 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) 4.0 mL를 첨가하여 혼합하였다. 위의 혼합액을 10 mL의 주사기에 넣고 교반되고 있는 0.2

M CaCl₂ 용액내로 주사기의 바늘을 통해 한 방울씩 투입하였다. 30분간 계속하여 교반시킨 후에 bead를 같은 buffer로 3회 세척하고 4°C에 보관하였다.

공유결합을 통한 고정화

키토산과 glutaraldehyde를 이용하는 경우: 5% (w/v)의 glutaraldehyde가 포함된 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) 10 mL에 키토산 1 g을 넣고 30°C에서 1시간 동안 반응을 통해 활성화시켰다. 이것을 Whatman filter paper (No. 4)로 여과한 후에 반응되지 않고 남아 있는 glutaraldehyde를 제거하기 위해 증류수로 세척하였다. 세척된 키토산에 동일한 buffer 8 mL와 효소용액 2 mL를 첨가하였고, 30°C에서 24시간동안 혼합시키면서 반응시켰다. 다시 증류수와 buffer로 번갈아 가며 세척한 후에 최종적으로 같은 buffer 담아 4°C에 보관하였다.

CNBr-activated sepharose 4B를 이용하는 경우: CNBr-activated sepharose 4B, 1 g을 1 mM HCl로 세척하고 효소용액 0.5 mL와 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0)를 첨가하여 30°C에서 60 rpm으로 부드럽게 교반하면서 12시간동안 담체와 coupling시켰다. 담체와 효소의 coupling 반응을 중지시키기 위해 동일한 buffer를 용매로 하여 제조한 blocking 용액인 0.2 M glycine 용액으로 담체를 이동시켰다. Buffer로 담체를 3~4회 세척하고 동일한 buffer에 suspension시켜 4°C에 보관하였다.

Silica carrier와 glutaraldehyde를 이용하는 경우: 네 종류의 silica 담체(silica gel, glass bead, magnesium silicate, silica gel 60)를 준비하고 각 1 g에 2.5% glutaraldehyde 용액 10 mL를 첨가하고 상온에서 2시간 동안 활성화시켰다. 활성화된 담체로부터 반응되지 않은 glutaraldehyde를 제거하기 위해 증류수로 세척하였고 효소용액 1 mL와 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0), 9 mL를 더하여 상온에서 12시간 동안 coupling시켰다. 동일한 buffer로 담체를 세척하여 결합이 되지 않은 효소를 제거하였고 buffer에 분산시켜 4°C에 보관하였다.

Metal chelation을 이용한 방법

10 g의 microcrystalline cellulose를 petri dish에 넣고 15% (w/v) HCl을 용매로 한 15% (w/v) MnCl₂ 용액, 50 mL를 첨가하여 고르게 섞었다. NaOH가 들어있는 네시케이터에 이 혼합액을 넣고 진공으로 한 후 45°C에서 완전히 건조시켰다. 건조된 담체를 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0)로 세번 세척한 후 여기에

효소용액을 첨가하여 10°C에서 18시간 동안 교반하였다. 상등액을 따라버리고 동일한 buffer로 2회 세척한 다음, 1 M NaCl 용액으로 담체를 세척하고 추가로 buffer 단독으로 남은 NaCl을 제거하였다. FeCl₃도 같은 방법을 거쳐 고정화담체로 활용하였다.

결과 및 고찰

이온결합 및 흡착

여러 종류의 담체를 전처리한 후에 TG를 고정화시킨 결과는 Fig. 1과 같다. 사용한 담체중 이온교환수지와 흡착제중에서는 DEAE-sephadex가 고정화효소 단위무게(dry base)당 가장 높은 수율(33.1%)을 보였고, 다음은 Diaion HP-20이 높은 것으로 나타났다. *Bacillus stearothermophilus*의 pullulanase의 고정화⁽²⁰⁾에서 Amberlite류가 0.5-1.0%, Sephadex DEAE-25가 16%의 수율에 비하면 비교적 높은 수율이었다. Diaion HP-20은 여러 논문에서도 인용된 담체로서 효소의 고정화에 빈번히 사용되고 있다^(17,19). 그러나 이온결합이나 흡착에 의한 효소고정화는 operational stability가 낮은 것이 단점이고⁽¹⁸⁾, entrapment에 의한 고정화는 operational stability는 좋은 편이나 활성이 낮은 것이 단점인 것으로 알려져 있다⁽¹⁸⁾.

Entrapment

본 실험에서 제조한 4%와 7% alginate 용액과 TG의 혼합액으로부터 생성된 bead는 직경이 약 3 mm 정도로 균일한 bead 형태로 제조되었으나 10% alginate의 경우에는 높은 점도로 완전한 구형의 bead가 만들어

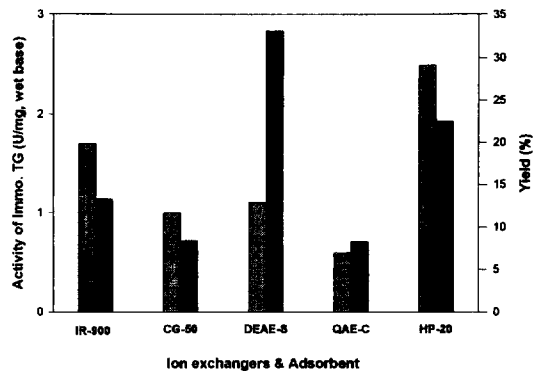


Fig. 1. Comparison of activities and immobilization yields of transglucosidase immobilized on various kinds of ion exchangers and adsorbent (IR-900: Amberlite IR-900, CG-20: Amberlite CG-20, DEAE-S: DEAE-Sephadex, QAE-C: QAE-Cellulose, HP-20: Diaion HP-20). ■: Immobilized enzyme activity, ■: Yield.

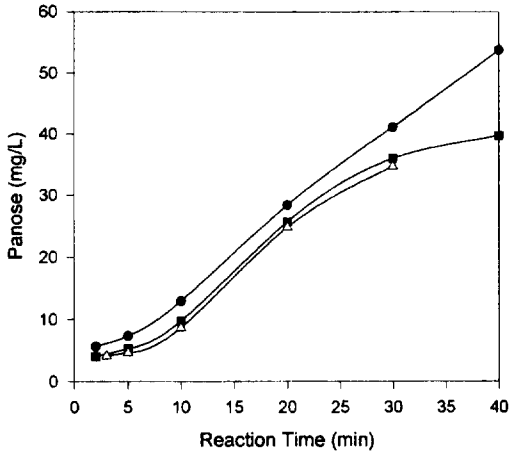


Fig. 2. Time courses of the formation of panose from maltose by immobilized transglucosidase in calcium-alginate beads using 1% maltose solution as substrate at 40°C and pH 5.0. ●—●: 4% Na-alginate, ■—■: 7% Na-alginate, △—△: 10% Na-alginate.

지지 않았다. 4%, 7%, 10% alginate 용액으로부터 얻어진 각각의 bead를 일정 무게씩 취하여 maltose를 기질로 하여 반응시간에 따른 panose 생성량을 나타내 보면 Fig. 2와 같다. 같은 시간동안 반응을 시키는 경우 초기 alginate 농도가 낮을수록 panose의 생성량이 더 높게 나타났다. 이것은 기질인 maltose가 bead의 내부로 확산되는데 대한 저항과 bead 내에서 효소에 의해 생성된 반응산물이 다시 bead 밖으로 확산되는데 대한 저항이 초기 alginate 농도가 높은 bead일수록 크기 때문이다. 실제로 entrapment된 고정효소의 겉보기 활성은 다른 고정화 방법에 의한 TG와 반응하는 경우보다 낮게 나타난다. 한편 반응 30분이 지나면 4% alginate로 만들어진 bead의 경우에는 panose의 생성량이 반응시간에 따라 지속적으로 증가하는데 반하여 7%와 10%는 증가되는 경향이 완만해짐을 알 수 있었다.

공유결합에 의한 고정화

Glutaraldehyde를 이용한 공유결합 방법: 키토산은 많은 효소의 고정화에서 담체로 많이 이용되며 형태도 작고 납작한 pellet 형태로 존재하여 충전형 반응기의 운전시에 유속의 저하나 압력강하 등이 크지 않다는 장점이 있다. 그러나 키토산을 이용한 TG의 고정화에 대한 수율은 13.8%였다(Fig. 3). 이것은 pululanase를 키토산 담체에 glutaraldehyde를 이용하여 cross-linking 방법을 고정화시킨 경우의 수율(12.5%)과 유사한 결과였다⁽²⁶⁾. 그러나 magnesium silicate, sil-

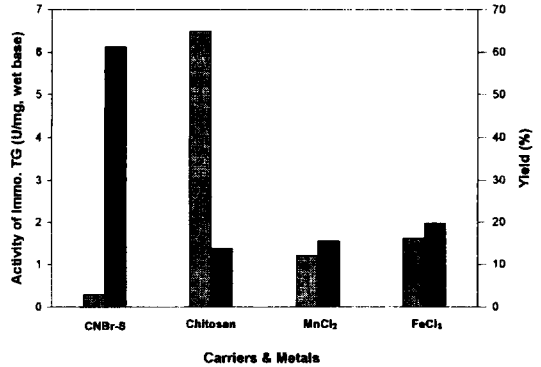


Fig. 3. Comparison of activities and immobilization yields of transglucosidase immobilized by covalent linkage and metal chelation on various kinds of carriers and metals (CNBr-S :CNBr-Sepharose). ▨: Immobilized enzyme activity, ▩: Yield.

ica gel, glass bead를 담체로 한 경우에는 키토산을 이용한 경우보다도 낮은 수율을 보였다.

CNBr-activated sepharose 4B를 이용한 공유결합 방법: CNBr-activated sepharose 4B는 기본담체인 sepharose에 imidocarbonate (I) (>C=NH)기가 이미 결합되어 있는 상태로서 다른 공유결합을 통한 고정화방법에 비하여 비교적 간편하며 coupling이 빠른 것이 장점이다. 본 실험에서 CNBr-activated Sepharose 4B를 이용한 고정화 수율은 61.3%로 가장 높은 수치를 보였다(Fig. 3). CNBr-activated sepharose 4B는 lignin peroxidase의 안정화를 위한 고정화 담체로 이용되었을 때 35%⁽²⁷⁾, alkaline phosphatase의 고정화에서는 30%의 수율을 보인다고 보고되었다⁽³¹⁾.

Metal chelation에 의한 결합

Metal chelation 방법에 의한 고정화 수율은 전반적으로 15~19% 수준으로 낮은 편이었다. Metal chelation 방법은 리간드결합을 하는 전이금속의 특성을 이용한 것인데, 담체의 활성화가 특별히 필요하지 않고 결합이 빨리 일어난다는 장점이 있으나⁽²⁸⁾, 고정화시키기 전의 전처리 과정이 까다롭고 고정화 과정중 건조과정으로 인해 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

고정화 방법의 선정

고정화 방법의 선정을 위해 여러가지 고정화 방법을 비교한 결과는 다음의 Table 1에 나타내었다. 여러 방법중 TG의 고정화를 위해서는 수율면에서 우수하고 간편성도 있는 CNBr-activated sepharose 4B를 이용한 고정화 방법을 선정하였다. DEAE-sephadex와

Table 1. Immobilization of transglucosidase on various matrices using various immobilization methods

Immobilization methods	Type of carriers	Dry solid of immobilized enzyme (%)	Immobilized enzyme activity (dry base) (U/mg)	Yield ¹⁾ (%)
Ionic bond & Adsorption	Amberlite IR-120	51.1	0.6	1.6
	IR-400	55.6	1.6	4.3
	IR-900	33.9	5.0	13.3
	CG-50	31.4	3.2	8.4
	DEAE-Sephadex	8.8	12.5	33.1
	QAE-Cellulose	19.1	3.1	8.3
	Diaion HP-20	29.4	8.5	22.5
Covalent Linkage	CNBr-Sephadex	6.4	4.6	61.3
	Chitosan	31.1	20.9	13.8
	Mg-Sillicate	49.6	1.6	2.1
	Silicagel 60	38.3	0.8	1.0
	Silica gel	69.2	0.1	0.2
	Glass bead	98.3	0.1	0.1
Entrapment	Ca-Alginate (4%)	4.1	2.4	29.0
	Ca-Alginate (7%)	4.5	0.9	0.1
Metal Chelation	MnCl ₂	51.3	2.3	15.5
	FeCl ₃	53.7	3.0	19.7

¹⁾Yield=(Immobilized enzyme activity/Applied enzyme activity)×100 (%)

Diaion HP-20은 CNBr-activated sepharose 4B를 이용한 경우보다 고정화 수율과 안정성이 낮았기 때문에 고정화방법으로 선정하지 않았다. 또 entrapment에 의한 고정화 방법은 확산저항이 있기 때문에 겔보기 반응속도가 낮으며, bead 내부의 microenvironment에서 생성된 반응산물이 축적되면 당전이 반응에 대한 활성과 함께 가수분해 활성도 가지고 있는 TG에 의해 가수분해되므로써 최종 반응산물의 생성이 저하되는 결과를 유발하게 되므로 본 TG의 고정화 방법으로 선정하지 않았다. 이와 유사한 결과는 고정화 α-amylase⁽²⁹⁾와 고정화 glucoamylase⁽³⁰⁾의 경우에도 보고된 바가 있다. 이 외에도 미생물에 의해 분해되기 쉽고 충전형 반응기에 적용할 때 압축되기 쉬워서 기질 용액의 흐름을 저하시키며 압력강하를 유발시키는 단점이 있다.

요 약

이소말토올리고당의 생산에 사용되는 *Aspergillus niger* 유래의 TG의 고정화를 위해 여러가지 방법을 비교하여 고정화방법을 선정하였다. 이온결합과 흡착, entrapment, 공유결합과 금속이온을 이용한 결합 등을 이용하여 TG의 고정화를 시도하였다. TG의 고정화를 위해서는 수율면에서 우수하고(61.3%) 간편성도 있는 CNBr-activated sepharose 4B를 이용한 고정화 방법을

선정하였다. DEAE-sephadex를 이용한 이온결합에 의해서는 33.1%, Diaion HP-20를 이용한 흡착법에 의해서는 22.5%의 수율을 보였으나 CNBr-activated sepharose 4B를 이용한 고정화 방법에 비해 수율과 안정성이 낮아 제외하였다. Entrapment에 의한 고정화는 bead내의 확산저항으로 인해 최종산물의 생성에 불리한 것으로 판단되었고 magnesium silicate, silica gel, glass bead 등의 담체를 이용한 고정화방법은 낮은 수율로 인해, 금속이온을 이용한 경우 역시 낮은 수율과 장시간의 준비로 인해 고정화방법으로 부적당하다고 판단되었다.

감사의 글

본 과제를 지원해 준 한국과학재단에 감사드립니다.

문 헌

1. Nunokawa, Y.: Oligosaccharides in sake. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **28**, 109 (1981)
2. White, J.W. and Hoban, N.: Composition of honey. IV. Identification of the disaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 386 (1959)
3. Nishino, R., Ozawa, Y., Yasuda, A. and Sakasai T.: Oligosaccharides in soy souce, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **28**, 125 (1981)
4. 菅野智榮: イソマルトオリゴ糖. 機能性食品と開發展望. シ-エムシ, 東京, p89 (1988)

5. Takanobu, K., Fukui, F., Takaku, H., Machida, Y., Arai, M. and Mitsuoka, T.: Effect of isomaltooligosaccharides on human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora*, **7**, 61 (1988)
6. 이현우: 올리고당의 기능성 및 식품에의 이용. *식품기술*, **7**, 49 (1994)
7. Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. and Tashiro Y.: Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, **5**, 37 (1986)
8. Delzenne, N.M. and Roberfroid, M.R.: Physiological effects of non-digestible oligosaccharides, *Leswnsm. -Wiss. u. -Technol.*, **27**, 1 (1994)
9. Hamada, S., Koga, T., Fujiwara, T. and Ooshima T.: Role of oligosaccharides in dental caries development. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **31**, 83 (1984)
10. 박관화: 기능성당의 종류와 특성. 올리고당의 기능성 (한국식품과학회 심포지움), **1** (1994)
11. 浜田茂幸, 大鳥隆: 蟲齒の病因を食品の開發. *食品と開發*, **29**, 4 (1994)
12. 高添一郎, 松久保隆: 口腔保健における砂糖代替糖の意義. *食品と開發*, **29**, 8 (1994)
13. Kaneko, T., Kohmoto, T. and Kikuchi, H.: Digestibility of isomaltooligosaccharides by rats and effects on serum lipids. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **66**, 1211 (1992)
14. 金昌睦: 올리고糖. 機能性食品의 導入과 개발동향, **24** (1992)
15. 권혁권, 육철: 이소말토올리고당의 물리화학적 특성 및 식품에서의 이용, *생물산업*, **7**, 26 (1994)
16. 서진호: 국내 올리고당 연구 및 개발동향. 올리고당의 기능성(한국식품과학회 심포지움), **56** (1994)
17. Yosida, M., Kimura, T., Ogata, M. and Nakakuki, T.: Immobilization of the the exo-maltotetraohydrolase and some properties of the enzyme. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **35**, 245 (1988)
18. Abdel-Naby, M.A.: Immobilization of *Aspergillus niger* NRC 107 xylanase and β -xylosidase, and properties of the immobilized enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **38**, 69 (1993)
19. Kimura, T., Ogata, M., Yosida, M. and Nakakuki, T.: Continuous production of maltotetraose using immobilized *Pseudomonas stutzeri* amylase. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 669 (1988)
20. Ravet, C., Thomas, D. and Legoy, M.D.: Gluco-oligosaccharide synthesis by free and immobilized β -glucosidase, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 303 (1993)
21. Kizawa, H., Shinoyama, H. and Yasui, T.: The Synthesis of new xylosyloligosaccharides by transxylosylation with *Aspergillus niger* β -xylosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 671 (1991)
22. Kim, M.H.: Production of fructooligosaccharides using immobilized β -fructofuranosidase. Seoul National university *Ph.D thesis* (1994)
23. Hayashi, S., Tubouchi, M., Takasaki, Y. and Imada, K.: Long-term continuous reacton of immobilized β -fructofuranosidase. *Biotechnol. Letters*, **16**, 227 (1994)
24. 안장우, 홍승서, 박관화, 서진호: *Aspergillus niger* 유래의 Transglucosidase의 이소말토올리고당 생성반응 특성. *한국식품과학회지*, **28**, 273 (1996)
25. 안장우: *Aspergillus niger* 유래의 Transglucosidase에 의한 이소말토올리고당의 생산. 서울대학교 박사학위 논문 (1995)
26. Manolov, R.J., Kambourova, M.S. and Emanuilova, E.I.: Immobilization and properties of *Bacillus stearothermophilus* pullulanase. *Appl. Biochem.*, **18**, 409 (1993)
27. Asther, M. and Meunier, J.C.: Immobilization as a tool for the stabilization of lignin peroxidase produced by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **38**, 57 (1993)
28. Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S.: Immobilization of enzymes on transition metal-activated supports. In *Methods In Enzymology*, Academic Press, **135**, p117 (1987)
29. Maria, I., Sisso, G., Graber, M., Condoret, J.S. and Combes, D.: Effect of diffusional resistance on the action pattern of immobilized alpha-amylase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **48**, 185 (1990)
30. Lee, D.D., Lee, K.L., Reilly, P.J. and Lee, Y.Y.: Effect of pore diffusion limitation on dextrin hydrolysis by immobilized glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1 (1980)
31. Shan, Y., McKelvie, I.D. and Hart, B.: Characterization of immobilized *Escherichia coli* alkaline phosphatase reactors in flow injection analysis. *Anal. Chem.*, **65**, 3053 (1993)

(1996년 9월 25일 접수)