

특집 새로운 감미료의 산업적 이용과 전망

Stevioside의 생산, 당전이반응 및 활용 (Production, Transglycosylation and Application of Stevioside)

박동찬, 이용현^{*}

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Abstract

Stevioside is a sweet glycoside extracted from the leaves of the plant *Stevia rebaudiana* Bertoni and has been widely utilized as an alternative sweetener in foods, pharmaceuticals, and alcoholic beverage. In this article, the structure and physicochemical properties of stevioside, production methods of natural and transglycosylated stevioside, the status of the stevioside as an alternative sweetener with high intensity, and the application fields of stevia sweeteners were described. Two heterogeneous enzyme reaction systems, attrition coupled enzyme reaction system using insoluble raw starch as the glycosyl donor and heterogeneous enzyme reaction system using extrusion starch as the glycosyl donor, have been suggested for the production of transglycosylated stevioside and their feasibilities for industrial application were investigated. Above two heterogeneous enzyme reaction systems showed several advantages over the conventional reaction system using soluble liquefied starch as the glucosyl donor, such as high transglycosylation yields, fast reaction rate, and easy purification of produced transglycosylated stevioside. Finally the future consumption trends of the stevioside was discussed.

Key words: stevioside, transglycosylated stevioside, heterogeneous enzyme reaction system, attrition coupled reaction system, extrusion starch

서 론

감미료로써 가장 많이 사용되어 온 것은 설탕이지만 과다섭취에 기인하는 부작용이 널리 인식되면서, 그 수요가 선진국에서는 1970년대 말을 고비로 점차 감소하는 추세에 있고, 이를 대체할 다양한 종류의 대체감미료가 개발되고 있다. 현재 사용되고 있는 대체감미료는 원료에 따라 당질계와 비당질계로 나눌 수 있는데, 당질계에는 설탕을 효소 작용시킨 palatinose, fructooligosaccharide, 유당에 효소 반응을 시킨 galactooligosaccharide와 전분을 이용하여 효소작용을 시킨 maltooligosaccharide, isomaltooligosaccharide. 그리고 전분당을 수소화시킨 sorbitol, maltitol 등의 당알콜계가 있다. 비당질계 감미료는 aspartame, saccharin, acesulfame-K와 같은 각종 합성감미료와 thaumatin, stevioside, glycyrrhizin, dihydrochalcone, monellin 등과 같은 식물에서 추출한 천연감미료가 여기에 속한다(1,2).

대부분 합성감미료는 pH나 열 등 외부조건에 대한 높은 안정성과 대량생산 가능성 등 많은 장점을 지니고 있으나, 감미료로써 사용할 때 독성 및 인체에 대한 안전성에 대한

논란이 항상 제기된다. 이러한 문제점 때문에 자연계에 존재하는 천연대체감미료의 탐색과 이용에 관한 관심이 제고되고 있다. 천연감미료는 식물의 뿌리, 잎, 열매 등에 함유된 감미성 천연화합물로 인공적으로 제조된 합성감미료가 지니는 독성 및 인체의 안정성에 대한 염려가 적고, 일반적으로 감미도는 설탕에 비해 상당히 높아 그 사용이 점차 증대되고 있는 추세를 보이고 있다(1,3).

천연대체감미료로써 현재 가장 널리 사용되고 있는 stevioside는 남미 파라과이가 원산지인 국화과 다년생 초본 *Stevia rebaudiana* Bertoni에 함유된 배당체로, 감미도는 설탕의 250~300배에 달하며, 설탕의 감미질과 가장 유사한 감미료로서 설탕의 단점인 당뇨병과 비만을 예방할 수 있는 천연감미료로 주목받고 있다. *Stevia* 건엽은 파라과이, 브라질 등 남미에서는 수백년 동안 사용되어 왔으며, 현재 일본, 한국을 중심으로 의약품, 과자, 스낵, 소주, 장류, 절임식품, 수산가공품 등에 사용되고 있다. Stevioside는 사카린이나 아스파탐이 갖는 발암성, 열과 pH에 대한 불안정, 낮은 용해도 등의 문제점을 가지지 않는 천연물 유래 감미료로서, 그 사용량이 점차 증가하고 있다(1,2,4).

^{*}Corresponding author

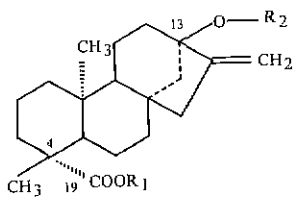
본고에서는 stevioside의 구조와 특성, stevioside 제품의 종류 및 제조법, 효소를 이용하여 stevioside의 감미와 물성을 개선한 당전이 stevioside의 종류와 제조법, stevia 감미료의 활용분야, 그리고 불용성 생전분을 당공여체로 이용하는 분쇄마찰매체 효소반응계와 팽윤 extrusion 전분을 당공여체로 이용하는 불균일상 효소반응계 등 두 종류의 불균일상 효소반응계에서의 당전이 stevioside의 제조법에 관하여 기술하고자 한다.

Stevioside의 구조 및 특성

Stevia 식물에 함유된 감미성분으로는 stevioside를 비롯하여 rebaudioside-A, C, D, E 및 dulcoside-A 등이 있으며, 그 구조는 Fig. 1과 같이 steviol을 aglycon으로 하는 diterpene 배당체이다. Stevia 잎에 함유된 감미성분은 stevioside와 rebaudioside A가 주요 성분이며, 기타 감미성분은 미량 함유되어 있다. 이들 감미성분은 결합된 당의 종류 및 위치에 따라 감미도에 차이가 있다(5-7).

Stevioside의 감미도는 일반적으로 설탕의 300배인 것으로 알려져 있으나, 비당질형의 고분자 감미물질과 같이 농도의 증가에 따라 감미도가 저하된다. 즉 stevioside가 역치부근에서는 설탕에 비해 270~300배의 감미도를 나타내나 설탕 농도 5~6%의 감미에 상당하는 농도에서는 120배 전후로서 감미배율이 상당히 저하된다. Table 1에서와 같이 설탕 농도 1.08%일 때의 감미도가 277배임에 비하여 5.33%일 때는 감미도가 감소하였다. 따라서 실용 농도범위라면 감미도는 설탕의 120~150배가 된다(5).

Rebaudioside A는 stevioside에 비하여 감미도가 약 30%



	R ₁ (19-Carboxyl)	R ₂ (13-Hydroxyl)	Sweetness (× Sucrose)
Stevioside	Glc	Glc ² -Glc	140~300
Rebaudioside-A	Glc	Glc ² -Glc ¹ -Glc	200~450
Rebaudioside-C (Dulcoside B)	Glc	Glc ² -Rham ¹ -Glc	40~60
Rebaudioside-D	Glc ² -Glc	Glc ² -Glc ¹ -Glc	150
Rebaudioside-E	Glc ² -Glc	Glc ² -Glc ¹ -Glc	100~150
Dulcoside A	Glc	Glc ² -Rham	40~60

Glc: Glucose, Rham: Rhamnose

Fig. 1. Sweet component contained in stevia leaves.

Table 1. Sweetness intensity of stevioside and rebaudioside A

Sucrose concentration(g/100ml)	1.08	2.08	3.45	5.33
Relative sweetness(× Sucrose)				
Stevioside	277	231	200	141
Rebaudioside A	324	312	259	200

강하며, dulcoside A 및 B는 감미도가 떨어진다. Dulcoside B의 감미도는 설탕의 약 50배 정도이다. 이와 같은 감미도의 차이와 화학구조상의 특징과의 관계에 대해서는 아직 명확하게 규명되지 않았으나, 배당체의 당 결합위치나 관능기(특히 OH기)의 배열 및 그 배치상의 상호거리에 따라 감미도 및 감미의 질이 크게 좌우되는 것으로 알려져 있다(8).

Stevioside의 감미질은 glycyrrhizin, phylloolulcin에 비하여 설탕에 유사하고 뒷맛이 적다. 또한 잔미곡선은 Fig. 2에서와 같이 설탕에서처럼 급속히 감미가 없어지지 않는으나 glycyrrhizine 보다는 덜하다(5,7). Stevioside 미질의 단점은 쓴맛이나, 실용농도에서는 이러한 문제는 어느정도 경감된다. Stevia 건엽을 물로 추출한 상태에서는 이미, 이취가 있으나 membrane 혹은 이온교환수지를 사용하여 정제하면 이미, 이취는 많이 완화된다. 또한 고미제로서 구연산 혹은 glycine을 사용하면 고미로 인한 장애를 많이 제거할 수 있다. 특히 설탕, 과당 등 당질계 감미료와 병용할 경우 감미질과 동시에 감미도도 상승시킬 수 있으며, 또한 유기산, 아미노산류와 병용시 감미도의 증가와 함께 감미질의 개선효과를 얻을 수 있다(9-11).

Stevioside는 다른 감미료의 감미개량제로도 이용되는데 사카린이나 glycyrrhizin은 stevioside 감미제와 혼합사용함으로써 미질의 개선을 도모할 수 있다. 감미도와 함께 감미의 질도 각 유도체에 따라 서로 상이한데 stevia 감미물질 중 미질 및 감미도에 있어 rebaudioside A(monoglucosyl stevioside)가 가장 양호하다고 알려져 있다. Stevioside는 수용성으로 통상 물 혹은 열수에서 추출되나 정제된 고순도의 것은 용해도가 0.12%로 물에 잘 용해되지 않는다. 따라서 설탕 농도 15% 이상의 감미를 가지는 용액을 만

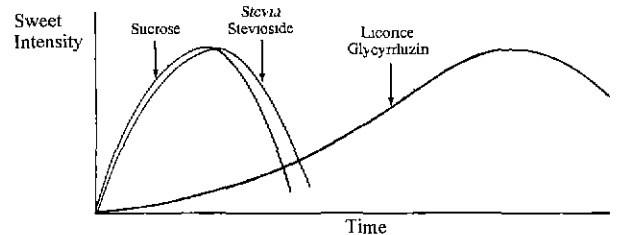


Fig. 2. Taste profile of natural sweeteners at equal sweetness intensity(4).

들려면 소량의 ethanol에 먼저 녹인 다음 물에 희석하는 방법으로 용해하여야 한다. Stevioside 감미제의 용해도는 stevioside의 순도와 관계가 있으며, 순품에서 보다 정제된 stevioside 제품에서 용해도가 훨씬 증가하며, monoglucosyl stevioside가 stevioside에 비하여 물에 대한 용해성이 더 양호하다(7).

가공식품에서 조리나 살균과정에서 대부분 가열처리가 요구되므로 식품첨가물에 있어서의 내열성은 중요한 의미를 갖는다. 일반적으로 stevioside는 열안정성이 큰 것으로 알려져 있는데 stevioside의 수용액을 1시간 정도 끓여도 감미의 감소가 없으며, stevioside 자체의 손실도 없었다고 한다. pH 4 및 pH 10의 산성 및 알칼리성 영역에서 100°C, 5시간 가열하여 stevioside 양의 변화를 찾아볼 수 없으나, pH 3 이하에서 강하게 가열하면 분해가 일어난다. Stevioside는 diterpene 배당체이므로 amino-carbonyl 반응을 일으킬 수 없는 비착색성의 감미물질이다. 아미노산과 stevioside 혼합액을 100°C, 60분간 가열하여도 거의 착색현상을 나타내지 않아 간장 등의 가공식품에 적합하다(5,7).

가열 혹은 보존료 첨가를 할 수 없는 절임류에 당을 첨가하면 절임 중에 미생물이 당을 영양원으로 하여 급속히 증식하므로 부패나 발효가 촉진된다. Stevioside는 그 자체가 보통의 미생물에 이용되지 못하며, 혹 배당체가 분리되어 미생물의 탄소원이 될 수도 있으나, 그 양은 매우 적다. 한편 5~18%의 식염수에서도 침전형성이나 감미변화를 일으키지 않기 때문에 절임류에서는 stevioside의 이러한 성질을 이용할 수 있다. 또한 stevioside는 생체내에서 흡수되지 않고 그대로 배설됨으로 칼로리가 전혀 없다. 따라서 저칼로리를 목적으로 하는 다이어트 식품에 이용이 적합하다(2,3).

Stevioside의 장래를 좌우하게 될 관건이 되는 요소의 하나는 역시 안정성을 지적할 수 있다. Stevioside 감미료의 안정성에 관해서는 수많은 논의가 되어 시험성적이 여러차례 보고되어 있다. 이러한 결과를 조합하여 보면 stevioside 감미료는 극히 안정성이 높은 식품첨가물로 결론지어진다. 남미 원주민들은 400년 이상 stevia 건엽을 마쇄하여 그대로 감미료로 사용해 오고 있으나 안정성을 의심할 만한 징후는 나타나지 않고 있다. 또한 일본의 stevia 간담회를 중심으로 급성 독성시험, 아급성 독성시험, 만성 독성시험, 암원성시험, 변이원성시험 및 임신억제에 관한 시험 등을 행하여 과학적으로 그 안정성을 확인하였다(4,12-14).

Stevioside의 제조

현재 시판되는 stevioside는 제조방법에 따라 다음과 같

이 대략 4종류로 분류할 수 있다(1,7).

1) 추출제품

Stevia 감미성분을 추출하여 합성수지 등을 이용 정제 건조한 제품으로 stevia 건엽에 함유된 감미성분이 그대로 존재하며, 추출제품의 대부분은 순도가 80~90% 정도로 감미질이 떨어지고 쓴맛이나 냄새가 잔존하는 단점이 있다.

2) 결정성 제품

추출 정제한 감미성분을 알콜 등의 유기용매로 결정 석출시켜 정제한 제품으로, 결정 석출조건에 따라 stevioside와 rebaudioside-A의 비율을 조정할 수 있으나 대략 7:3의 비율로 분포된다. 함량 98% 이상으로 고순도제품이지만 수율측면에서는 비경제적인 단점이 있다.

3) Rebaudioside-A 고함량 제품

앞서 설명한 바와 같이 rebaudioside-A는 stevia 감미성분의 일종이지만 stevioside에 비해서는 감미질이 비교적 우수하다. 따라서 stevia 건엽에서 추출 정제된 추출액에서 rebaudioside-A를 별도로 분리하여 고함량으로 만든 제품이나 보통 stevia 건엽 중에는 소량 함유되어 있기 때문에 가격적으로 극히 불리한 단점이 있다.

4) 당전이 stevioside

CGTase, fructosyltransferase 등과 같은 각종 당전이 효소를 이용하여 stevioside의 원배당체에 glucose나 fruc-

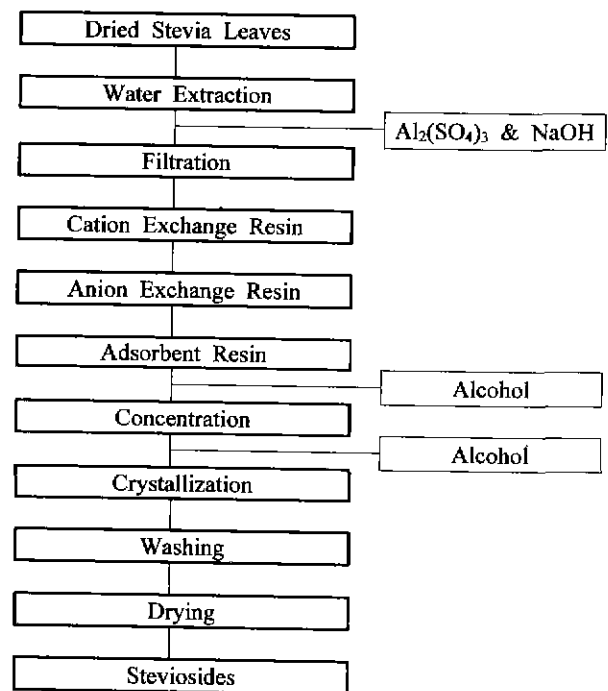


Fig. 3. Flow diagram for the extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana* using ion exchange resin.

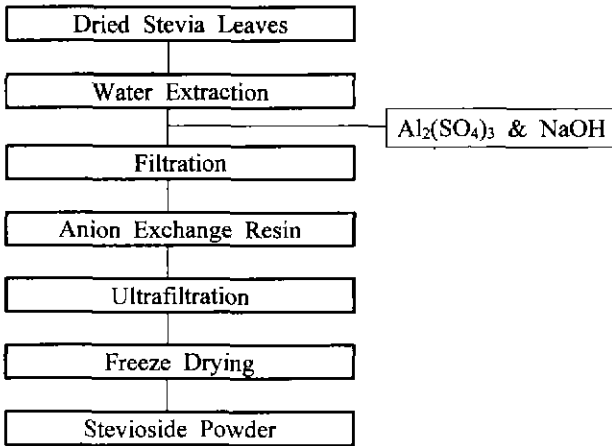


Fig. 4. Flow diagram for the extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana* using ultrafiltration membrane.

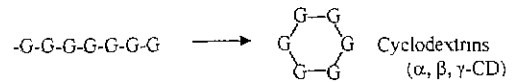
tose를 당전이 시킨 감미료이다. 감미질, 용해성이 현저히 개선되어 설탕의 감미에 가장 친근한 감미질을 나타낸다.

Stevia 전엽에서 감미성분의 추출에는 열수 혹은 에탄올, 메탄올 또는 폴리알콜류가 이용되고 있다. 추출액은 색소 등을 함유하고 있기 때문에 진한 갈색을 띠고 있으며, 특유의 맛과 냄새를 가지는데 이를 정제하여 순도 높은 제품을 만들어야 한다. Stevioside의 정제는 크게 이온수지를 이용한 정제방법과 한외여과막을 이용한 방법이 있다(7). 수지를 이용한 정제방법은 Fig. 3에서와 같이 stevia 추출액을 양이온 및 음이온 교환수지를 이용하여 추출액을 정제하고, 특수한 수지에 감미성분을 흡착시킨 후 용제로서 용출시키고, 농축 결정화시켜 제품을 얻는 방법으로 이 방법은 고순도의 제품을 얻을 수 있는 반면 제조공정이 복잡하고 정제에 많은 비용이 따르는 단점이 있다. 한외여과막을 이용한 정제법은 Fig. 4와 같이 stevia 추출액을 일정 크기의 분자량을 가진 물질만을 여과할 수 있는 ultrafiltration membrane을 이용하여 농축 겸 정제한 후 제품을 얻는 제조법으로 수지 정제에 비해 순도가 낮은 제품이 생산되지만 정제공정이 간단하고 정제수율이 높은 장점이 있다.

당전이 Stevioside의 종류 및 특성

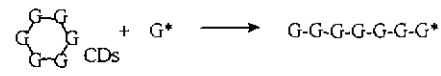
당전이 stevioside는 효소의 작용을 이용하여 stevioside의 미질을 개량한 감미료로서 현재 실용화되어 있는 것으로 α -glucosyl stevioside가 있다. 천연상태의 stevioside는 설탕에 비해 감미 발현이 늦고, 특이한 쓴맛이 있으며, 후미가 오래 지속되는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완시켜 감미질을 개선시키기 위하여 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase), β -galactosidase, β -fructosidase, α -ga-

1 Intramolecular Transglycosylation(Cyclizing)

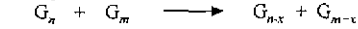


2 Intermolecular Transglycosylation

• Coupling



• Disproportionation



3 Hydrolysis

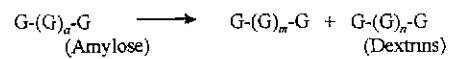
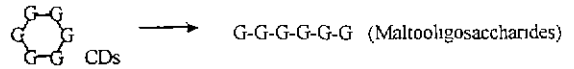


Fig. 5. Various catalytic reactions of cyclodextrin glucanotransferase(CGTase).

lactosidase와 같은 당전이 효소를 작용시켜 stevioside에 glucose, fructose, 또는 galactose 분자를 전이 결합시킨 각종 당전이 stevioside 유도체를 제조하고 있다(15-24).

여기서 당전이된 유도체는 원래의 stevioside에 비하여 고미 및 후미가 감소하여 설탕에 보다 가까운 감미질을 나타내게 되며, 또한 청량감을 갖는 장점이 있다. 이러한 천연상태의 stevioside 보다 품질이 개량된 고감미도, 고감미질의 각종 stevioside 유도체들이 속속 개발되어 이들이 각종 다이어트 식품, 음료 등에 널리 이용될 것으로 예상되며 시장성은 증가될 것으로 기대된다.

Stevioside의 당전이 효소로 가장 널리 사용되고 있는 효소는 CGTase인데 주로 *Bacillus*속 미생물이 생산하는 효소이며, CGTase가 촉매하는 반응은 Fig. 5와 같이 분자내 당전이반응인 cyclization 반응과 분자간 당전이반응인 coupling, disproportionation 반응으로 구분할 수 있다. 이러한 당전이반응 이외에도 CGTase는 전분, amylose, 또는 CD를 가수분해하는 활성도 갖고 있다(25).

CGTase의 당수용체로는 glucose, xylose, inositol, sucrose, maltose, cellobiose 등의 당류와 stevioside, hesperidin, rutin, naringin 등의 배당체류, ascorbic acid, phenol 화합물 등 매우 다양한 화합물이 이용될 수 있다(26-35).

Stevioside를 당수용체로 이용할 경우 CGTase는 Fig. 1의 stevioside 구조내의 glucose 분자에 α -1,4결합으로 glucosyl기를 전이결합시켜주며, steviol 골격의 13번 탄소에 결합하는 glucose 분자에 전이되면 미질이 개량되고 동시에 감미도 강하게 되지만 19번 탄소에 결합하는 glucose 분자에 전이되는 경우 감미는 저하된다고 알려져 있다.

기존 액화전분을 당공여체로 활용하는 당전이 Stevioside의 제조법

당전이 stevioside의 제조에는 전분에 내열성 액화효소를 첨가한 후 120°C에서 증자 가열하여 가용화시킨 액화전분 또는 호화 텍스트린 등을 당공여체로 주로 사용하며, 이렇게 액화된 전분질과 stevioside의 혼합액을 50°C 정도 까지 냉각한 후 CGTase와 같은 당전이 효소를 첨가하여 당전이 stevioside를 생산한다. 이러한 효소반응계는 당공여체인 전분, 당수용체인 stevioside, 당전이 효소, 그리고 당전이 stevioside 등 모든 성분이 물에 녹아있는 균일상 효소반응계이다.

이와 같은 기존의 균일상 효소반응계를 이용하는 방법은 전분 또는 전분질을 증자 액화시키는데 다량의 에너지가 소모되고, 모든 성분이 수용상태로 혼합되어 있어 반응 후 생성된 당전이 stevioside의 분리 정제가 어렵고, 잔류 전분이 수용상태이므로 분리 재활용이 용이하지 않다. 또한 반응액 중에 다량의 maltooligo당이 잔류하며, 당전이 반응 수율이 낮은 등 많은 결점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 새로운 효소반응계의 개발에 대한 요구가 요망된다.

분쇄마찰매체 효소반응계를 활용한 당전이 Stevioside의 제조

분쇄마찰매체 효소반응계는 생전분을 기질로 한 각종 amylase계통의 효소반응시 고품의 마찰매체를 첨가하여 무중자 상태에서 전분입자의 단편화를 유도하여 효소의 작용을 촉진시키는 불균일상 효소반응계이다. 본 연구실에서는 이러한 분쇄마찰매체를 활용한 포도당, 맥아당, 그리고 cyclodextrin 생산에 관한 연구를 수행한 바 있으며 (36-41), 최근에는 생전분을 당공여체로 한 분쇄마찰매체 효소반응계에서 CGTase를 이용하여 당전이 stevioside를 생산하는 고효율 당전이 효소반응계에 관한 일련의 연구 결과를 발표한 바 있다.(42-46).

생전분을 당공여체로 이용하는 분쇄마찰매체 효소반응계에서 각종 당류와 배당체를 당수용체로 이용하여 당수용체 특이성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 대부분의 당류에서 당전이반응이 관찰되었으며, 특히 glucose의 경우 79%, maltose는 82%, sucrose는 72%, 그리고 cellobiose는 77%로 높은 전환수율을 보였다. 한편 배당체인 stevioside는 전환수율이 82%에 이르러 당전이반응이 매우 원활히 진행됨을 알 수 있었다. 따라서 분쇄마찰매체 함유 효소반응계는 당전이반응을 이용하는 각종 전이당 제조, 특히 산

Table 2. Transglycosylation of various acceptors in attrition coupled reaction system using raw starch as a glucosyl donor

Acceptors	Transglycosylation yield(%)
Monosaccharides	
D-Glucose	79.0
D-Xylose	41.0
myo-Inositol	43.2
Disaccharides	
Maltose	82.0
Cellobiose	77.3
Sucrose	72.4
Glucosides	
Stevioside	81.0

Reaction was carried out at the condition of 1mM acceptor/g of starch, 100g of raw corn starch/L, 400g of glass bead/L, 1,200units of CGTase/g starch, pH 6.0 and 50°C for 24hr

업적으로 중요한 coupling sugar나 당전이 stevioside의 합성에 유용하게 활용될 수 있음을 제시하고 있다.

분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분을 당공여체로 하는 stevioside의 당전이반응 양상은 Fig. 6과 같다. 또한 생전분을 당공여체로 사용하지만 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 경우와 기존의 제조방법에서와 같이 증자액화전분을 당공여체로 사용하는 경우도 비교하였다.

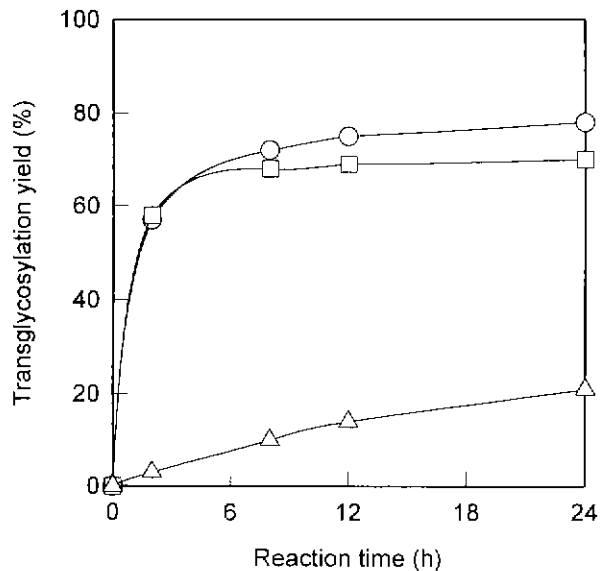


Fig. 6. Comparison of the progresses of the transglycosylation reaction of stevioside in the three different reaction system.

Reaction was carried out at the condition of 0.1M stevioside, 100g of raw starch/L, 1,200units of CGTase/g starch, pH 6.0, 50°C and (with bead 400g glass bead/L). Raw starch as the glycosyl donor with (○) or without (△) bead, and liquefied starch as the donor(□).

분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 경우 전환수율은 매우 낮아 24시간 후에도 21%에 불과하였다. 반면 기존의 방법인 증자액화전분을 사용한 경우의 24시간 후의 전환수율은 71%였다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서는 초기에는 반응속도가 액화전분을 사용한 경우 보다 다소 낮았으나 그 후 반응이 활발히 진행되어 8시간 후에는 당전이수율이 액화전분을 능가하였고, 24시간 후에는 81%에 이르렀다. 초기 반응속도가 다소 낮은 것은 전분입자의 단편화가 충분히 진행되지 못하여 효소반응 가용표면적이 제한되나, 그 후 전분입자의 단편화가 급속히 진행되어 효소반응이 원활하게 이루어지기 때문인 것으로 유추된다.

또한 반응액 중의 glucose 및 각종 maltooligo당($G_2 \sim G_7$)의 함량은 HPLC chromatogram 상에서 관찰한 결과 액화전분을 사용한 경우에 비하여 낮은 것으로 관찰되었으며, 환원당 농도를 glucose를 표준물질로 하여 DNS법으로 분석한 결과 24시간 후 분쇄마찰매체 효소반응계는 0.2g/L, 액화전분의 경우는 8.0g/L였다. 이는 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 CD 합성에서 관찰한 바와 같이 생전분 입자의 비환원성 말단으로부터 CGTase의 작용이 진행되어 maltooligo당 및 limit dextrin과 같은 미반응 잔기의 형성이 억제되는 반면, 액화전분의 경우는 증자액화과정과 CGTase의 작용 후 생성된 maltooligo당과 당전이 미반응 잔기가 반응계에 축적되기 때문으로 유추된다.

이와 같은 maltooligo당의 소량 생성은 stevioside에 대한 당전이 수율을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 반응 부산물이 적으므로 고순도 당전이 stevioside 생산이 가능하게 된다. 또한 당공여체인 미반응 잔류전분은 불용성 상태로 존재하므로 반응액으로부터 쉽게 분리할 수 있다.

Table 3은 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분을 당공여체로 이용한 경우와 액화전분을 당공여체로 한 경우

의 각 반응변수를 비교한 것이다. 위에서 설명한 바와 같이 생전분을 당공여체로 하는 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 당전이반응은 모든 성분이 수용상태로 혼합되어 있는 기존의 전이당 제조법과는 달리 반응수율이 높고, 미반응 전분의 분리가 용이하며, 부산물인 maltooligo당의 함량이 낮아 고순도의 전이당을 얻을 수 있으며, 분리정제도 용이한 등 많은 장점이 예상된다.

분쇄마찰매체함유 불균일상 효소반응계에서 생전분을 당공여체로 한 stevioside의 당전이반응 mechanism은 생전분으로부터 CD가 먼저 생성되고 생성된 CD가 개환되어 stevioside에 당이 전이되는 기작으로 진행됨을 밝혔다. 또한 CD와 stevioside간의 bireactants 당전이반응은 random sequential bireactant mechanism으로 설명될 수 있음을 알았으며, stevioside와 당전이 stevioside 간의 평형상태가 존재하며, 당전이반응을 장시간 동안 수행하여도 어느 수준 이상으로는 당전이반응이 더 이상 진행되지 않음을 알 수 있었다. Thin layer chromatography를 이용하여 당전이 stevioside의 당결합 양상을 규명한 결과 glucose분자가 stevioside에 α -1-4-glucosidic bond로 결합되어 있음을 확인하였다(44). 위와 같은 반응기작을 바탕으로 당전이 stevioside 생산반응의 kinetics에 관한 연구를 수행하였으며, 고효율 당전이 효소반응기 개발을 위한 기초자료를 확보하였다(45).

불용성 Extrusion 전분을 당공여체로 활용하는 불균일상 효소반응계에서의 당전이 Stevioside 제조

분쇄마찰매체 효소반응계와는 달리 생전분의 구조를 효소의 작용이 용이하도록 변환시키는 방법으로 생전분을 extrusion 처리하여 전분의 구조를 팽윤시키는 방법이 있

Table 3. Comparison of the reaction parameters for transglycosylation of stevioside in the attrition coupled enzyme reaction system using raw corn starch and conventional system using liquefied starch as the glucosyl donor(1)

	Raw starch	Liquefied starch
Transglycosylation yield(%)	81.0	71.0
Concentration of transglycosylated stevioside(g/L)	65.2	57.1
Half reaction time(hr) ¹⁾	1.6	0.8
Residual cyclodextrin concentration(g/L)	21.0	22.0
Residual maltooligosaccharides concentration(g/L)	0.2	8.0
Separation of residual maltooligosaccharides	Not required	Required
Separation of residual starch	Easy	Difficult
Separation purification of transglycosylated stevioside	Easy	Difficult

Reaction was carried out at the condition of 1mM stevioside/g of starch, 100g of raw corn starch/L, 400g of glass bead/L, 1,200units of CGTase/g starch, pH 6.0 and 50°C for 24hr

¹⁾Time required for half of the maximum transglycosylation yield

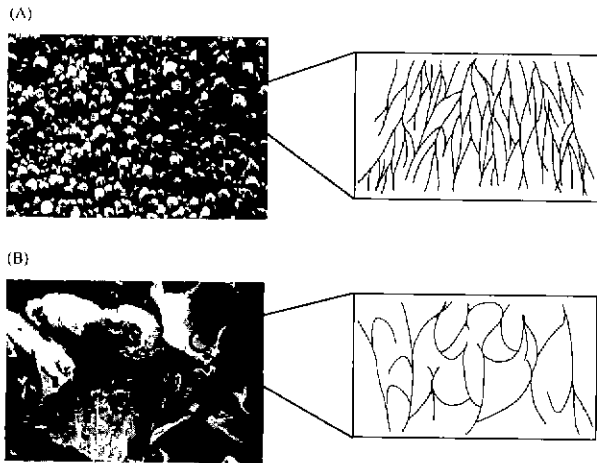


Fig. 7. Scanning electron microscopic photographs and hypothetical micellar structures of raw and extrusion starch. (A) Raw starch, (B) Extrusion starch

다. Extrusion 전분의 구조는 Fig. 7과 같이 전분분자의 micelle 구조가 완화되어 전분입자내로의 물분자의 침투가 용이한 구조가 되며, 효소의 작용이 매우 용이한 구조가 된다. 본 연구실에서는 extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 고순도, 고효율의 CD 생산과 고순도, 고농도의 maltose 생산에 대한 연구를 수행한 바 있다 (47-55). 또한 extrusion 전분을 당공여체로 한 불균일상 효소반응계에서 CGTase의 당전이반응을 관찰하였으며, 당전이 stevioside 생산에 관한 연구도 수행하였다(52,56,57). Table 4는 당공여체로 extrusion 전분을 이용하고 당수용체로 단당류인 glucose, xylose, inositol, mannose, galactose, ribose, sorbose, fructose, 이당류인 maltose, sucrose, cellobiose, lactose, 그리고 배당체류인 stevioside, hesperidin, naringin, salicin, rutin을 이용하였을 때의 당전이 수율을 증가액화전분을 당공여체로 한 경우와 비교한 결과이다. 모든 당류와 배당체류에서 extrusion 전분을 당공여체로 이용한 경우가 액화전분을 당공여체로 이용한 경우보다 당전이 수율이 높게 나타났으며, 특히 glucose의 경우 단당류 중 가장 높은 당전이성을 나타냈으며, 24시간 반응 후 당전이 수율은 52.4%로 액화전분을 사용한 경우의 32.1% 보다 매우 향상되었다.

단당류의 경우 glucose, ribose, xylose, inositol 등이 당수용체로 이용되어 당전이반응이 일어났으나, mannose, galactose, ribose, rhamnase, 그리고 fructose와 같은 단당류는 당전이반응이 일어나지 않았다. 이와 같은 현상은 α -CD를 당공여체로 이용한 실험에서도 관찰한 바와 같이 효소의 당수용체 특이성에 의한 것으로 단당류 중에서 2-, 3-, 그리고 4-번 위치의 OH기 configuration이 α -D- glu-

Table 4. Comparison of transglycosylation yields for various saccharides and glucosides as a glucosyl acceptor using extrusion and liquefied starch as the glucosyl donor

Saccharides	Extrusion starch	Liquefied starch
Monosaccharides		
D-Glucose	51.7	32.2
D-Xylose	31.0	26.2
L-Sorbose	51.3	42.1
myo-Inositol	37.2	25.4
D-Ribose	N.D.	N.D.
D-Galactose	N.D.	N.D.
Disaccharides		
Maltose	82.3	71.0
Cellobiose	76.3	67.2
Sucrose	65.4	61.3
Maltotol	78.6	70.1
Glucosides		
Stevioside	78.4	66.2
Hesperidin	63.5	52.4
Naringin	N.D.	N.D.
Rutin	N.D.	N.D.
Salicin	69.5	54.2

Reaction was carried out at the condition of 50g/L acceptor, 50g/L extrusion starch, 900units/g starch CGTase, pH 6.0 and 50°C for 24hr

N.D.: Not detected

copyranose와 동일한 equatorial 형태인 것이 당수용체로 적절한 것과 유사한 결과로서, extrusion 전분을 당공여체로 이용할 경우 이러한 CGTase의 당수용체 특이성에는 변화가 없었으며, 다만 당전이 수율이 향상되는 것을 알 수 있다.

이당류를 당수용체로 이용하였을 경우에도 extrusion 전분을 이용한 경우 액화전분을 이용한 경우보다 당전이 수율이 매우 향상되었으며, 특히 maltose, sucrose, cellobiose가 높은 당전이 수율을 보여 각각 89.5, 76.0, 67.8%의 당전이 수율을 나타내었다. 또한 이러한 당전이 수율은 단당류의 것 보다 더 높은 값을 나타내었는데, 이러한 결과는 앞에서 관찰한 바와 같이 효소의 당전이반응에 대한 친화성이 단당류 보다는 이당류가 더 높다는 결과와 일치하는 것이다.

Fig. 8은 extrusion 전분을 이용한 불균일상 효소반응계에서 stevioside의 당전이 효용성을 비교하기 위하여, 구조 변형되지 않은 생전분과 기존의 제조방법에서와 같은 액화전분을 당공여체로 한 경우의 당전이 수율을 경시적으로 비교한 결과이다.

생전분만을 당공여체로 하는 경우의 전환수율은 매우 낮아 24시간 후에도 21%에 불과하였으며, 결정형의 입자 구조를 가진 생전분의 효소분해 한계성을 나타내고 있다.

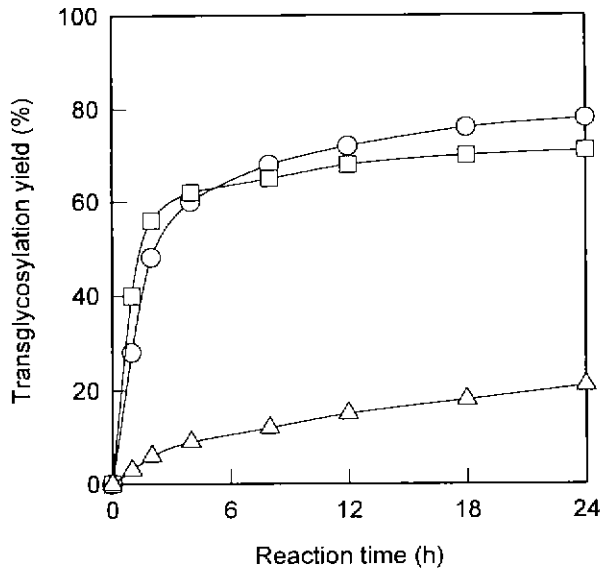


Fig. 8. Comparison of the progresses of the transglycosylation reaction of stevioside in the enzyme reaction system using raw, extrusion, and liquefied starch as the glucosyl donor.

Reaction was carried out at the condition of 20g/L stevioside, 50g/L starch, 900 units CGTase/g starch CGTase, pH 6.0 and 50°C.

Extrusion starch(○), liquefied starch(□) and raw starch(△) as the glucosyl donor.

Extrusion 전분을 당공여체로 한 경우는 생전분을 이용한 경우에 비하여 당전이반응 속도 및 수율이 현저히 증가하였다. 기존의 액화전분을 당공여체로 이용한 경우와 비교하면, 반응 초기의 속도는 거의 유사하였으며, 액화전분의 경우 4시간 경과 후 반응이 거의 완료되어 최종 당전이 수율은 66%에 머무르는데 반하여, extrusion을 이용한 경우는 반응 4시간 이후에도 꾸준히 반응이 진행되어 최종 당전이 수율은 78%에 이르렀다.

이와 같은 높은 반응속도와 수율이 얻어진 것은 전분의

결정성 입자구조가 extrusion에 의해 팽윤, 파괴되어 효소의 작용이 용이한 구조로 변형될 뿐만 아니라 반응액 중에 colloidal 상태로 분산되고 전분입자내로 물분자와 효소가 흡수되기 쉬우므로 효소가 작용할 수 있는 가용 표면적이 현저히 증가되기 때문인 것으로 유추된다.

또한 CGTase의 작용은 전분분자의 말단으로부터 시작되며, 당전이반응의 경우에도 CD 합성을 경유하여 반응이 진행되므로, 반응 후의 나머지 부분은 전분입자 형태로 존재하므로 반응계내에 glucose, maltose와 같은 환원성 당류가 축적되지 않는다. 반면, 액화전분은 전분분자가 절단된 형태로 존재하므로 반응 후 남은 dextrin이나 환원당류가 상당량 생성되게 되며, 이러한 환원당류는 CGTase의 당수용체로 작용할 수 있어 원래의 당수용체에 대한 당전이반응을 저해하게 된다. 따라서 extrusion 전분을 이용한 당전이반응은 액화전분 보다 수율이 상당히 증가하는 것으로 판단된다.

위에서 살펴 본 것과 같이 extrusion 전분을 당공여체로 이용한 불균일상 효소반응계에서의 당전이반응은 속도와 수율이 액화전분을 이용했을 때 보다 높을 뿐만 아니라 반응 후 잔류 전분이 불용성 상태로 존재하므로 원심분리 또는 여과법과 같은 간단한 단위조작으로 분리해 낼 수 있어, 수용상태의 액화전분을 사용할 경우에서와 같은 잔류기질의 분리를 위한 복잡한 분리 정제공정을 간단하게 할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 분리된 전분의 재활용 및 전분에 흡착된 효소의 재사용이 가능한 등 여러가지 장점이 예상되는 효율적인 당전이 효소반응계로 판단된다.

Extrusion 전분을 당공여체로 이용하는 효소반응계에서 stevioside의 당전이반응의 최적 조건은 적정 효소 사용량 800~1,000unit/g starch, 전분의 호화도가 40~70%, extrusion 전분에 대한 stevioside의 적정 혼합비 2 : 5~5 : 5 (g/g, stevioside : extrusion starch), 당수용체와 당공여체

Table 5. Comparison of the reaction parameters for transglycosylation of stevioside in the heterogeneous enzyme reaction system using extrusion starch and conventional system using liquefied starch as the glucosyl donor(52)

	Extrusion starch	Liquefied starch
Transglycosylation yield(%)	78.4	66.2
Concentration of transglycosylated stevioside(g/L)	47.2	39.7
Half reaction time(hr) ¹⁾	1.2	0.8
Residual cyclodextrin concentration(g/L)	21.0	22.0
Residual maltooligosaccharides concentration(g/L)	<0.6	>8.0
Separation of residual maltooligo-saccharides	Not required	Required
Separation of residual starch	Easy	Difficult
Separation purification of transglycosylated stevioside	Easy	Difficult

Reaction was carried out at the condition of 50g/L stevioside, 50g/L extrusion starch, 900 units/g starch CGTase, pH 6.0 and 50°C for 24hr

¹⁾Time required for half of the maximum transglycosylation yield

혼합물의 적정 첨가 농도는 반응액의 원활한 혼합을 이루어지는 50~70g/L 범위로 판단된다.

Table 5는 extrusion 전분을 당공여체로 이용한 경우와 액화전분을 당공여체로 한 경우의 각 반응변수를 비교한 것이다. 앞에서 관찰한 바와 같이 같이 extrusion 전분을 당공여체로 하는 효소반응계에서의 당전이반응은 기존 액화전분을 이용하는 반응계에 비하여 반응수율이 높고, 미반응 전분의 분리가 용이하며, 부산물인 maltooligo당의 함량이 낮아 고순도의 전이당을 얻을 수 있으며, 분리정제도 용이한 등 많은 장점이 예상되는 산업적 활용성이 높은 고효율 반응계로 판단된다.

Stevioside 감미료의 활용 및 향후 전망

Stevioside는 과거에 수산가공식품, 스낵류 및 의약품 등에 소량 이용되어 왔으나, 근래 소주에 첨가되는 감미료로 이용됨으로써 그 사용량이 급격히 증가되고 있다. 또한 최근 합성감미료인 사카린의 사용 규제가 강화됨으로써 앞으로 장류식품을 비롯하여 아이스크림 등의 냉과류, 껌 등의 과자류, 그리고 유산균음료 등 가공식품의 전반에 걸쳐 사용이 확대되어 시장성은 날로 증가될 것으로 기대된다.

우리나라에서는 1984년 부터 보건복지부 산하 식품첨가물위원회 심의를 거쳐 식품첨가물로 지정되어 현재 4개사에서 순품 기준으로 연간 약 170톤 정도를 생산하고 있으며, 시장규모는 연간 약 100억원에 달하고 있다. 일본에서는 1977년 부터 식품첨가물로 지정하여 식품 전반에 널리 사용되어 대체감미료 시장의 41%(1988년도)를 차지하고 있으며, 시장규모는 연간 약 900억원으로 추정된다. 미국에서는 1991년까지 사용되어 오다 그 이후 사용금지되었으나, 1995년 9월 부터는 FDA에서 건강식품에 한하여 사용을 허용하고 있으며, 현재 파라과이로 부터 stevia 건엽을 연간 50톤씩 수입하여 다이어트 식품에 사용 중인 것으로 알려져 있다.

Stevioside의 국내 사용 허가에 있어서 빵, 유제품, 이유식 등 일부 식품에는 사용이 보류되었으나, 최근 일본에서 만성 독성시험이 완료되어 안전성에 전혀 문제가 없음이 확인됨에 따라 머지않아 국내 전체 식품에 사용이 가능하게 될 것으로 본다. 또한 분리정제 기술의 발전과 더불어 효소공학을 응용한 감미질이 더욱 개선된 당전이 stevioside 제품의 생산이 가능하게 됨으로써 기존 감미료에 대한 사용 비율이 점차 증가될 전망이다. 또한 stevia 식물 종의 감미성분을 증가시키거나 그 조성을 변화시키기 위한 생물공학적인 기술을 이용한 품종개발에 관한 연구도 활

발하게 진행되고 있어 앞으로 더욱 우수한 기능의 감미료의 생산이 기대되고 있다.

요 약

Stevioside는 남미 파라과이 원산의 국화과 식물인 *Stevia rebaudiana* Bertonii 유래의 천연대체감미료로서 식품, 의약품, 주류산업에 널리 활용되고 있다. 이와 같은 stevioside의 구조와 특성, 제조방법, 그리고 사용현황 등을 기술하였으며, 당전이 stevioside의 종류의 제조방법을 정리하였다. 본 연구실에서 개발한 생전분을 당공여체로 이용하는 분쇄마찰매체 효소반응계와 팽윤 extrusion 전분을 당공여체로 이용하는 불균일상 효소반응계에서의 stevioside 당전이반응의 특성과 산업적 활용 가능성을 검토하였다. 상기 두 종류의 불균일상 효소반응계는 높은 수율, 반응속도, 낮은 maltooligo당의 축적, 용이한 당전이 stevioside의 분리정제 등 기존의 액화전분을 당공여체로 이용하는 반응계에 비하여 많은 장점이 예상되는 산업적 활용 가능성이 높은 고효율 반응계임을 알 수 있었다. 끝으로 stevioside 감미료의 장래 전망에 관하여 예측하였다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 농업생명과학연구원 센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금과 한국과학재단 특정연구과제(과제번호 95-0402-05-01-3) 연구비에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. 이용현, 백승걸 : 대체감미료의 개발동향과 주류산업 주류공업, 14, 56(1994)
2. Franta, R. and Beck, B : Alternatives to cane and beet sugars. *Food Technol.*, 40, 116(1986)
3. Giese, J. H. : Alternative sweeteners and bulking agents. *Food Technol.*, 47, 114(1993)
4. Bakal, A. I. and Nabors, L. O. : Stevioside. In "Alternative Sweeteners" Nabors, L. O. and Gelardi, R. C.(eds.), 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, p.295(1990)
5. 井元勝恵 : ステビア. "食品新素材の開発と應用" 龜和田光男 監修 シ-エムシ-, 東京, p.190(1987)
6. Darise, M., Kohda, H., Mizutani, K., Kasai, R. and Tanaka, O. : Chemical constituents of flowers of *Stevia rebaudiana* Bertonii. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 133(1983)
7. 양한철 : 식품신소재학. 생체기능조절 천연소재연구회, 서울, p.273(1995)

8. Fukunaga, Y., Miyata, T., Nakayasu, N., Mizutani, K., Kasai, R. and Tanaka, O. : Enzymic transglucosylation products of stevioside : Separation and sweetness-evaluation. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1603(1989)
9. 三村くみ子 : 스테비오사이드의呈味改善方法. 公開特許公報, 昭57-150358(1982)
10. 八木佳明, 佐藤充克 : 新規なステビオ사이드類甘味料及びその製造法. 公開特許公報, 昭60-98957(1985)
11. 賀利昭代, 三崎満康 : 스테비오사이드의呈味改善方法. 公開特許公報, 昭60-188035(1985)
12. Suttajit, M., Vinitketkaumnien, U., Meevatee, U. and Buddhasukh, D. : Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environ. Health Perspect. Suppl.*, **101**, 53(1993)
13. 宇佐見誠, 酒見和枝, 川島邦夫, 津田充有, 大野泰雄 : 스테비오사이드의 라트を用いた催奇形性試験. 衛生試験所報告, **113**, 31(1995)
14. Murofushi, N., Shigematsu, Y., Nagura, S. and Takahashi, N. : Metabolism of steviol and its derivatives by *Gibberella fujikuroi*. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2305(1982)
15. Miyake, T. : Process for producing a sweetner. US Patent, 4,219,571(1980)
16. Tanaka, T., Hohda, H., Tanaka, O., Chen, R. H., Chou, W. H. and Leu, J. L. : Rubusoside(β -D-glucosyl ester of 13-O- β -D-glucosyl-steviol), a sweet principle of *Rubus chingii* Hu(Rosaceae). *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2165(1981)
17. Darise, M., Mizutani, K., Kasai, R., Tanaka, O., Kitahata, S., Okada, S., Ogawa, S., Murakami, R. and Chen, F. H. : Enzymic transglucosylation of rubusoside and the structure-sweetness relationship of steviol-bisglycosides. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2483(1984)
18. Kusama, S., Kusakabe, I., Nakamura, Y., Eda, S. and Murakami, K. : Transglucosylation into stevioside by the enzyme system from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 244(1986)
19. Ishikawa, H., Kitahata, S., Ohtani, K., Ikuhara, C. and Tanaka, O. : Production of stevioside and rubusoside derivatives by transfructosylation of β -fructofuranosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3137(1990)
20. Lobov, S. V., Kasai, R., Ohtani, K., Tanaka, O. and Yamasaki, K. : Enzymic production of sweet stevioside derivatives : Transglucosylation by glucosidases. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2959(1991)
21. Ohtani, K., Aikawa, Y., Ishikawa, H., Kasai, R., Kitahata, S., Mizutani, K., Doi, S., Nakaura, M. and Tanaka, O. : Further study on the 1,4- α -transglucosylation of rubusoside, a sweet steviol-bisglucoside from *Rubus suavis-simus*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 449(1991)
22. Lobos, S. V., Kasai, R., Ohtani, K., Tanaka, O. and Yamasaki, K. : Enzymatic production of sweet stevioside derivatives : Transglycosylation by glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2959(1991)
23. Kusakabe, I., Watanabe, S., Morita, R., Terahara, M. and Murakami, K. : Formation of a transfer product from stevioside by the cultures of Actinomycete. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 233(1992)
24. Yamamoto, K., Yoshikawa, K. and Okada, S. : Effective production of glycosyl-steviosides by α -1,6 transglucosylation of dextrin dextranase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1657(1994)
25. Kobayashi, S. : Cyclodextrin producing enzyme(CGTase). In "Enzymes for carbohydrate engineering" Park, K. H., Robyt, J. F. and Choi, Y. D.(eds.), Elsevier Science B. V., Amsterdam. p.23(1996)
26. Okada, S., Kitahata, S., Shiosaka, M., Bunya, H., Kubota, M., Sakai, S. and Tsujisaka, Y. : Application of cyclodextrin glucanotransferase. *Denpun Kagaku*, **38**, 211(1991)
27. Sato, M., Matsuo, T., Orita, N. and Yagi, Y. : Synthesis of novel sugars, oligoglucosyl-inositols, and their growth stimulating effect for *Bifidobacterium*. *Biotechnol. Lett.*, **13**, 69(1991)
28. Shibuya, T., Miwa, Y., Nakano, M., Yamauchi, T., Chaen, H., Sakai, S. and Kurimoto, M. : Enzymatic synthesis of novel trisaccharide, glucosyl lactoside. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 56(1993)
29. Suzuki, Y. and Suzuki, K. : Enzymatic formation of 4^G- α -glucopyranosyl-rutin. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 181(1991)
30. Aga, H., Yoneyama, M., Sakai, S. and Yamamoto, I. : Synthesis of 2-O- α -glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearo-thermophilus*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1751(1991)
31. Ezure, Y. : Enzymatic synthesis of 4-O- α -D-glucopyranosyl-moranoline. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2159(1985)
32. Kometani, T., Terada, Y., Nishimura, T., Takii, H. and Okada, S. : Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 517(1994)
33. Vetter, D., Thorn, W., Brunner, H. and Konig, W. A. : Directed enzymatic synthesis of linear and branched gluco-oligosaccharides, using cyclodextrin-glucanosyltransferase. *Carbohydr. Res.*, **223**, 61(1992)
34. Kometani, T., Terada, Y., Nishimura, T., Takii, H. and Okada, S. : Transglycosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1990(1994)
35. Kometani, T., Tanimoto, H., Nishimura, T. and Okada, S. : A new method for precipitation of various glucosides with cyclodextrin glucanotransferase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1185(1993)
36. 이용현, 조구형 : 분쇄마찰매체 함유 효소반응계를 이용한 무증자 corn starch의 고농도 당화와 당화액의 조성에 관한 연구. 산업미생물학회지, **14**, 29(1986)
37. 이용현, 박진서 : 분쇄마찰 효소반응계에서의 *fungamyl* α -amylase를 이용한 생전분의 직접전환에 의한 maltose 생

- 산. 산업미생물학회지, **19**, 290(1991)
38. 이용현 : 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 생전분의 maltose로의 직접전환. 미생물과 산업, **17**, 22(1991)
 39. Lee, Y. H. : Mechano-enzyme reaction engineering. Proceedings of the Second Korea-US Joint Seminar on Bioprocess Technology, KOSEF/NSF, Seoul, p.91(1991)
 40. 한일근, 이용현 : 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 cyclodextrin의 생성과 cyclodextrin glucanotransferase의 작용 mechanism. 산업미생물학회지, **19**, 163(1991)
 41. Lee, Y. H. : A novel process for production of cyclodextrin in the heterogeneous enzyme reaction system. Proceedings of the First International Symposium on the Development of Natural Resources and Environmental Preservation, Korea University, Seoul, p.104(1992)
 42. 이용현, 신현동, 박동찬, 백승걸 : 당전이감미료의 효소적 제조방법. 특허공보 B1-3818, p.39(1995)
 43. 이용현, 백승걸, 신현동, 박동찬 : 분쇄마찰매체 불균일상 효소반응계에서의 cyclodextrin glucanotransferase의 당전이반응. 산업미생물학회지, **21**, 461(1993)
 44. 백승걸, 박동찬, 허태린, 이용현 : 분쇄마찰매체 불균일상 효소반응계에서 생전분을 당공여체로 한 stevioside의 당전이 반응 mechanism. 산업미생물학회지, **22**, 283(1994)
 45. 박동찬, 백승걸, 이용현 : 생전분을 당공여체로 한 stevioside의 당전이반응의 동력학적 해석. 한국생물공학회지, **9**, 108(1994)
 46. Lee, Y. H. : Transglycosylation of stevioside in a attrition coupled reaction system using raw starch as a glycosyl donor. Proceedings of the First Korea-Japan Joint Symposium on Enzyme Technology, Taejon, p.4(1995)
 47. 이용현, 박동찬 : 구조변형시킨 불용성 전분(질)을 이용한 불균일상 효소반응계에서의 사이클로덱스트린 효소 합성 방법. 특허공보 B1-3178, p.35(1992)
 48. 이용현, 박동찬 : Extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 cyclodextrin 효소합성. 산업미생물학회지, **19**, 514(1991)
 49. Lee, Y. H. and Park, D. C. : Direct synthesis of cyclodextrin in a heterogeneous enzyme reaction system containing insoluble extruded starch. In "Biochemical engineering for 2001" Furusaki, S., Endo, I. and Matsuno, R.(eds.), Springer-Verlag, Tokyo, p.127(1992)
 50. 이용현, 조명진, 박동찬 : 팽윤 전분을 기질로 한 cyclodextrin glucanotransferase의 cyclodextrin 생성반응 기작. 산업미생물학회지, **23**, 416(1995)
 51. 조명진, 박동찬, 이용현 : 팽윤 extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서 cyclodextrin 생성반응의 수치적 해석. 산업미생물학회지, **26**, 425(1995)
 52. Lee, Y. H. and Park, D. C. : Characteristics of carbohydrase reactions in heterogeneous enzyme reaction system utilizing swollen extrusion starch as a substrate. In "Enzymes for carbohydrate engineering" Park, K. H., Robyt, J. F. and Choi, Y. D.(eds.), Elsevier Science B. V., Amsterdam, p.171(1996)
 53. 이용현, 김동선, 신현동, 박진서 : Extrusion시킨 팽윤 전분을 기질로 한 새로운 maltose 생산법. 산업미생물학회지, **22**, 106(1994)
 54. 김동선, 박동찬, 조명진, 이용현 : 팽윤 extrusion 전분을 기질로 한 불균일상 효소반응계에서의 maltose 생성반응 특성. 산업미생물학회지, **22**, 252(1994)
 55. Lee, Y. H. : A novel enzyme reaction system for enzymatic production of cyclodextrin. Proceedings of the Second Korea-China Biotechnology Symposium, Seoul, p.42(1994)
 56. 이용현, 신현동, 박동찬, 백승걸 : 구조변형된 불용성 팽윤 전분을 당공여체로 사용하는 당전이 감미료의 효소적 제조 방법 특허공보 B1-3722, p.21(1994)
 57. Park, D. C., Kim, T. K. and Lee, Y. H. : Characteristics of transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase in the heterogeneous enzyme reaction system using extrusion starch as a glucosyl donor. *Enz. Microbial. Technol.*, submitted(1997)