

## 효소적 당전이 반응을 이용한 Alkyl $\beta$ -Glucoside의 생산

용환웅\* · 김선미\* · 심재훈†

한림대학교 식품영양학과

### Enzymatic Production of Alkyl $\beta$ -Glucoside Based on Transglycosylation Activity of Celluclast

Hwan-Ung Yong\*, Seonmi Kim\*, and Jae-Hoon Shim†

Dept. of Food Science and Nutrition, Hallym University, Gangwon 200-702, Korea

#### Abstract

Alkyl glucosides were synthesized using the transglycosylation reaction of Celluclast, the cellulase from *Trichoderma reesei*, with cellobiose and various alcohols. Glucose as a by-product of the reaction was removed using the immobilized yeast system. Among the alkyl glucoside products, the acceptor products of methanol and ethanol were confirmed as methyl  $\beta$ -D-glucopyranoside and ethyl  $\beta$ -D-glucopyranoside via MALDI-TOF MS and enzymatic analysis. Optimal yields of methyl  $\beta$ -glucoside and ethyl  $\beta$ -glucoside were 65.3% (mol/mol) and 59.0% (mol/mol), respectively, based on cellobiose consumed.

**Key words:** transglycosylation, alkyl  $\beta$ -glucoside, yeast-immobilization

#### 서 론

효소적 당전이 반응은 일반적으로 자연계에서 당전이 효소에 의하여 glycosyl donor가 다른 acceptor 물질의 작용기에 결합하는 반응으로서, 여러 biomolecule들의 구조적 다양성 및 기능을 확대시키는데 중요한 역할을 한다(1). 식품 분야에서도 다양한 당전이 반응이 시도되어, biomolecule의 수용성 증대, 안정성 증대 및 기능성 증대에 사용되었다(2-5). 탄수화물 가수분해 효소의 경우, 물 분자 대신 acceptor 물질이 효소 반응에 참여하게 되면 당전이 산물을 생산할 수 있으나, 가수분해 반응에 비하여 상대적으로 낮은 수율을 보인다(2,4,6,7).

Alkyl glycoside들은 비이온성 계면활성제 군에 속하는 화합물로서 세제뿐 아니라 식·의약품 소재로 많은 관심을 받고 있는 소재이다(8). 이러한 alkyl glucoside들은 화학적인 합성법이나 효소적 방법으로 생산할 수 있다. 화학적 방법의 경우 여러 반응 공정을 거쳐야 하는 단점이 있어 상업적 생산에 지장이 있는 반면에 축합반응이나 당전이 반응과 같은 효소적 방법을 사용하게 되는 경우 상대적으로 온화한 반응조건에서 반응을 진행할 수 있으며, 일반적으로 축합반응에 비하여 당전이 반응 속도가 빠르며 더 높은 수율을 지니고 있다(9-11).

Alkyl glycoside의 효소적 합성은 glucose의 환원성 말단

부위에 alkyl기가 연결되는 방식에 따라  $\alpha$ -glucoside와  $\beta$ -glucoside 합성으로 나눌 수 있다. Alpha form의 alkyl-glucoside 합성은 주로  $\alpha$ -amylase의 계열의 효소가 지니는 당전이 반응으로 진행되는데, 최근에는 sucrose를 기질로 하여 dextransucrase를 이용한 alpha form의 alkyl glucoside의 생산도 연구된 바 있다(12). Beta form의 alkyl-glucoside에 대한 연구는 이보다 전부터 활발히 이루어져 왔으며 주로 *Aspergillus niger* 유래의  $\beta$ -glucosidase를 이용하여 진행되었다(13,14). 특히 *Aspergillus niger* 유래의  $\beta$ -glucosidase II( $\beta$ -Glu II)는 높은 당전이 반응 활성을 지니고 있어 cello-oligosaccharide를 이용한 alkyl glycoside 생산에 매우 유리하다(14). 하지만 이러한 연구 결과들은 alkyl glycoside들의 기질별 반응 효율 및 효소반응 조건 최적화에 초점을 두어, 반응 부산물 제거 및 산물의 산업적 활용에 대한 연구는 미비한 실정이다(12-16).

*Trichoderma reesei* 유래의 cellulase인 Celluclast는 주로 cellulose, lignocellulose, carboxymethylcellulose 등과 같이  $\beta$ -1,4 glucosidic linkage를 지닌 화합물의 가수분해 반응에 활용되는 상용화된 효소로서(17), 가수분해 반응을 통한 벚짖이나 밀짖 등에 포함된 lignocellulose의 당화 연구에 주로 이용되고 있다(17-20). 본 연구에서는 상용화 효소인 Celluclast의 당전이 반응을 알아보고 이를 활용하여 다양한 종류의 alkyl glucoside들을 합성하고, 나아가 이전 연구

\*These authors contributed equally to the work.

†Corresponding author. E-mail: jhshim@hallym.ac.kr  
Phone: 82-33-248-2137, Fax: 82-33-251-2160

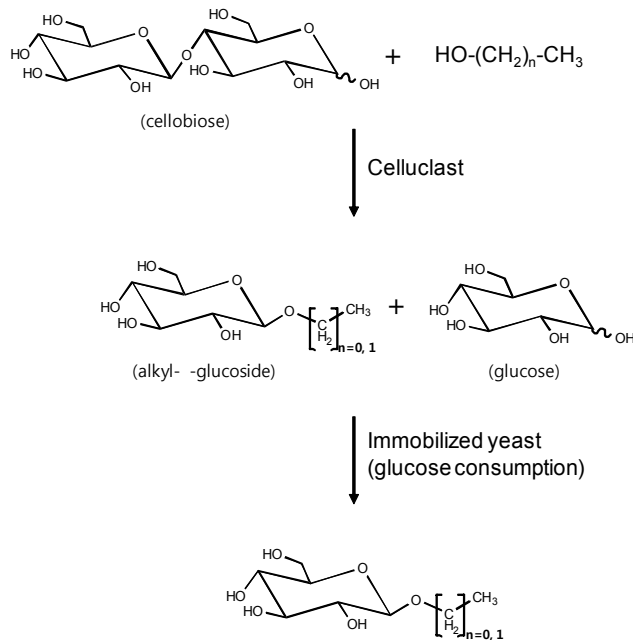


Fig. 1. Scheme of preparation of alkyl-glucosides using Celluclast and yeast immobilization system.

들에서 간과되었던 효율적인 반응 부산물 제거방법을 제시하여 alkyl glucoside의 친환경적인 생산법을 개발하고자 하였다(Fig. 1).

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 Celluclast와 건조효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 Novozyme Korea와 (주)비전바이오켵(Seongnam, Korea)에서 각각 제공 받았으며, cellobiose, methanol, ethanol, butanol, propanol, isopropanol, butanol은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 효소처리를 이용한 alkyl-glucoside의 생산

효소의 반응조건은 Yan 등(13)의 방법을 참고하여 실시하였다. Na-phosphate 완충용액(20 mM, pH 4.5)에 cellobiose와 ethanol을 2.5%(v/w)와 25%(v/v)의 농도로 맞추었고, 1 unit/mg 기질의 Celluclast를 첨가하여 55°C에서 효소 반응을 진행하였다. Methanol, propanol, isopropanol, butanol도 위와 같은 방법으로 실시하였다. 효소량 1 unit는 주어진 효소 반응 조건에서 1분간 cellobiose(Glc-Glc)의 β-1,4 결합을 가수분해하여 생산하는 glucose의 양(μmol)의 절반값으로 하였다.

### 고정화 효모의 제조

고정화 효모의 제조 방법은 Zhang 등의 방법을 응용하여 수행하였다(21). 건조효모 0.9%를 멸균 생리식염수(10%, w/

v)에 넣고 40°C에서 20분간 활성화시켰다. 활성화된 효모액을 동일량의 3% sodium alginate 용액에 섞은 후, 그 혼합액을 pipette을 이용하여 0.5 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 유입시켜 지름 4 mm 구슬 형태의 고정화 효모를 제조하였다. 고정화 효모는 증류수를 이용하여 세척 후 사용하였다.

### Thin layer chromatography(TLC) 분석

효소 반응결과를 분석하기 위하여 준비된 시료들을 TLC plate(Whatman K5F, Whatman, Maidstone, UK)에 loading 후 TLC chamber에서 전개하였다. 전개용매는 *n*-butyl alcohol, ethyl alcohol, distilled water가 5:5:3(v/v/v)의 비율로 구성하였다. 전개가 끝난 TLC plate는 건조시킨 후 발색시약(methanol 950 mL, sulfuric acid 50 mL, *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine 3 g)에 dipping한 후 110°C 오븐에서 10분간 건조하여 확인하였다(22).

### High performance anion exchange chromatography (HPAEC) 분석

각 시료의 잔당량 분석은 HPAEC(DX-500 system, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)에 CarboPac PA-1 column (4×250 mm, Dionex)을 장착하여 수행하였고, pulsed amperometric detector(ED40, Dionex)를 사용하여 검출하였다. 분석 용매로는 0.15 M NaOH가 사용되었고, Na-acetate의 양을 0 M에서 0.4 M까지 농도구배로 16분 동안 증가시켰다. Pump의 flow rate는 분당 1.0 mL로 하였고 준비된 시료는 membrane filter(0.45 μm, Advantec, Saijyo, Japan)를 이용하여 여과한 후 30 μL의 시료를 autosampler(AS3500, Spectra-physics, San Jose, CA, USA)를 이용하여 주입하였다(23).

### High performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 alkyl-glucoside의 분석

효소반응 후 생성된 alkyl-glucoside을 분석하기 위하여 Triart C18 column(5 μm, 150×4.6 mm; YMC, Kyoto, Japan)이 장착된 HPLC system(Ultimate 3000, Dionex)과 refractometer(Shodex RI-101, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile과 water 혼합액(10:90, v/v)을 이용하였고 이동상의 속도는 1 mL/min으로 하였다.

### Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) 분석

당전이 반응산물의 분자량 측정을 위하여 MALDI-TOF MS(Voyager TM-DE Perceptive Biosystems, Framingham, MA, USA)를 사용하였고, 분석은 linear mode에서 수행하였다. 5 mg/mL 시료를 2,5-dihydroxybenzoic acid(1 mg/mL)가 포함된 acetonitrile 용액과 동일한 비율로 혼합하여 1.5 μL 가량 stainless still plate에 loading 후 상온에서 건조시켜 분석을 수행하였다(12).

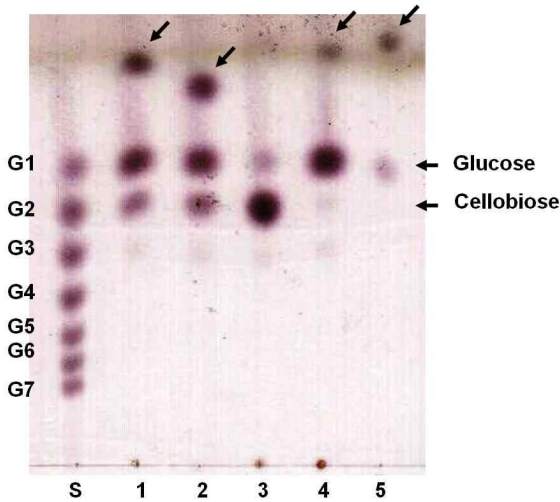


Fig. 2. TLC analysis of transglycosylation products generated by Celluclast using various alcohols. Lane 1, ethanol; lane 2, methanol; lane 3, propanol; lane 4, isopropanol; lane 5, butanol.

결과 및 고찰

다양한 알코올을 이용한 alkyl- $\beta$ -glucoside의 생산

당전이 반응을 위하여, 다섯 가지 종류의 알코올을 acceptor molecule로 사용하였다. 2시간의 효소 반응 후 ethanol, methanol, propanol, isopropanol 그리고 butanol에서 당전이 반응산물로 추정되는 물질이 검출되었다(Fig. 2). Ethanol과 methanol을 기질로 하는 반응에서는 donor molecule인 cellobiose가 일부 남아있었고, propanol의 경우에는 극히 일부의 cellobiose만이 가수분해 되었음을 알 수 있다. 이는 methanol, ethanol 그리고 propanol 등의 유기용매에서 효소 반응이 일부분 저해되고 있음을 의미한다. Secondary alcohol인 iso-propanol을 이용한 반응에서 효소의 가수분해 반응은 primary alcohol에 비하여 잘 진행되었으나 당전이 반응의 효율은 현저히 낮음을 확인하였다. 이는 secondary alcohol의 bulky한 구조가 cellulase의 substrate binding site에 잘 맞지 않음에 기인하는 것으로 사료되며, Kim 등(12)의 dextransucrase를 이용한 alkyl  $\alpha$ -glucoside 합성연구의 결과와 Lirprapamongkol과 Svasti(24)의  $\beta$ -glucosidase를 이용한 alkyl  $\beta$ -glucoside 생산에 관한 연구결과와도 유사한 성향을 보였다. 흥미롭게도 butanol을 이용한 반응의 경우, TLC 상에서 기질인 cellobiose와 반응 부산물인 glucose의 양이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었는데, 이는 butanol과 물이 층 분리되면서, 수용성 물질인 cellobiose와 glucose가 대부분 수용액 상에 남아있었기 때문이었다(data not shown). 또한, acceptor molecule들의 적절한 농도를 확인하고자 ethanol과 methanol의 농도를 10%(v/v)에서 30%(v/v)까지 5% 간격으로 당전이 반응을 실시하여 TLC로 분석한 결과, 기질농도 25%(v/v)에서 당전이 산물의 양이 가장 많았고, 30% 농도에서는 각각의 당전이 산물의 양이 매우 감

소하였다(data not shown). 이는 기질의 양이 증가함에 따라 당전이 반응산물의 생산량도 증가하나, 일정 수준 이상의 기질(유기용매) 첨가 시 단백질 변성에 의한 효소반응의 저해가 일어나는 현상으로 사료되며, Yan 등(14)이  $\beta$ -glucosidase를 이용한 실험 결과에서도 유사한 양상이 보고된 바 있다.

고정화 효모를 이용한 생산물의 정제

Ethanol을 기질로 사용하여 8시간 동안 충분히 효소반응을 수행한 후, 반응액에 남아있는 부산물(glucose)의 제거를 위하여 효소반응액과 Na-acetate 완충용액(20 mM, pH 6.0) 그리고 고정화 효모를 1:2:5(v/v/v)의 비율로 혼합하여 30°C에서 100 rpm으로 교반하여 반응하였다. 시간대별 glucose의 감소를 살펴본 결과 고정화 효모를 처리한 효소 반응액의 glucose 함량이 점차 감소하였고(Fig. 3A), HPAEC와 TLC로 분석한 결과 6시간 이후에는 glucose가 모두 제거되었다(Fig. 3B). 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 소당류를 탄소원으로 이용하며 이중 glucose를 선별적으로 선호한다. 이 특성은 본 연구에서 생산되는 부산물인 glucose의 제거에 매우 유용하다. 하지만 미생물을 이용한 반응은 제어가 용이하지 않고, 반응 후 미생물의 제거 또는 불활성화가 요구된다. 따라서 본 연구에서는 효모를 고정화하여 미생물 반응 제어를 용이하게 하였다.

효소 반응 생산물 분석

Methanol과 ethanol을 acceptor molecule로 이용한 효소 반응 생성물의 정확한 분석을 위하여 정제된 당전이 산물들의 분자량을 MALDI-TOF/MS를 수행하여 확인하였다.

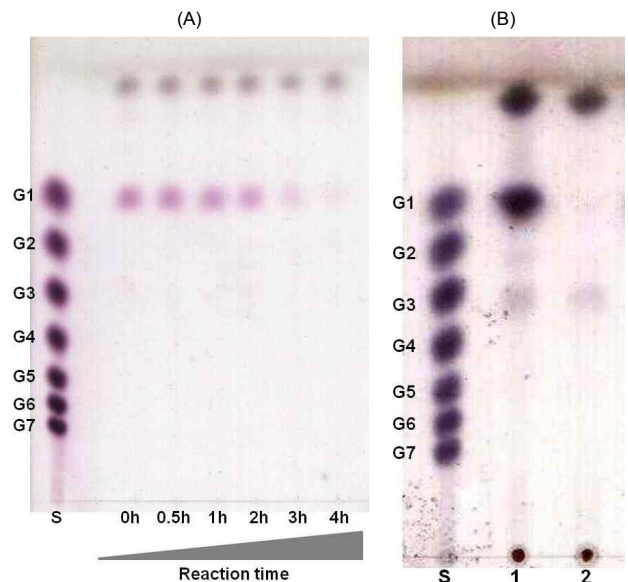


Fig. 3. Elimination of by-product using immobilized yeast. The amount of glucose molecules decreased gradually during yeast treatment (A). After 6-hour reaction, most of glucose molecules are removed (B). Lane 1, before immobilized yeast treatment; lane 2, after immobilized yeast treatment.

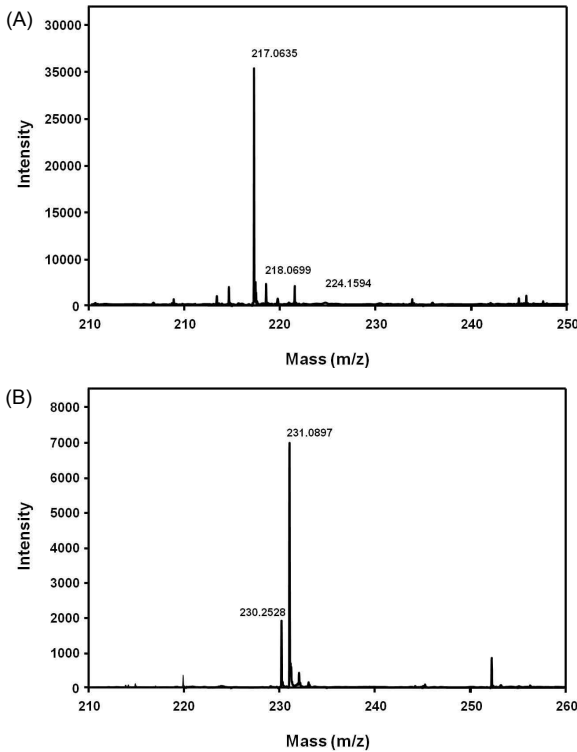


Fig. 4. MALDI-TOF MS analysis of transglycosylation products from methanol (A) and ethanol (B).

Fig. 4에서와 같이, methyl-glucoside와 ethyl-glucoside의 이온형에 대응하는 peak가  $m/z$  217( $M+Na^+$ )과  $m/z$  231( $M+Na^+$ )에서 검출되었고 이는 각각 methyl-glucoside와 ethyl-glucoside에 대응하는 분자량이었다. 또한 정확한 결합 구조를 확인하기 위하여,  $\beta$ -1,4-*O*-glucosidic linkage의 가수분해에 특이적으로 관여하는 Celluclast(1 U/mg, 기질)를 ethyl-glucoside에 처리한 후, 가수분해 여부를 확인하였다. Fig. 5에서 확인한 바와 같이 반응 산물들은 효소반응이 진행됨에 따라 그 양이 점차 줄어들었고, 이에 따라 방출되는 glucose의 양은 증가하였다. 12시간 반응 후 모든 ethyl-glucoside는 가수분해 되어 TLC 상에서 glucose만 검출되었으며, methyl-glucoside의 경우도 ethyl-glucoside와 동일한 결과를 확인하였다(data not shown). 따라서 methanol과 ethanol의 당전이 반응산물은 당의 1번 탄소와  $\beta$ -form의 *O*-glucosidic linkage를 형성하는 methyl  $\beta$ -D-glucoside와 ethyl  $\beta$ -D-glucoside임을 확인하였다. 또한, 반응 초기부터 G3(maltotriose) 부근에서 나타난 특이 물질은 효소반응에 의하여 생성된 product가 아닌 Celluclast 효소액 자체에 포함된 안정제 등일 것으로 사료된다(Fig. 5, lane 8).

Alkyl- $\beta$ -glucoside의 시간대별 생산량 분석

Methyl  $\beta$ -glucoside와 ethyl  $\beta$ -glucoside의 생산량을 HPAEC와 HPLC를 이용하여 time-course reaction을 통하여 알아보았다. 기질의 감소량과 alkyl-glucoside의 생산량을 시간대별로 살펴본 결과 methyl-glucoside와 ethyl-

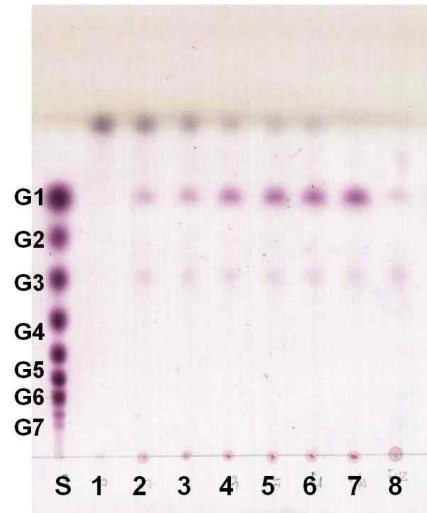


Fig. 5. Enzymatic degradation of ethyl glucoside with Celluclast. Lane S, standard; lane 1, 0 hr (w/o enzyme); lane 2, 0.5 hr; lane 3, 1 hr; lane 4, 3 hr; lane 5, 5 hr; lane 6, 7 hr; lane 7, 12 hr; lane 8, Celluclast enzyme (control).

glucoside 각각 9시간 부근에서 최대 생산량을 보였다. 특히 하계도 9시간 이후에는 각각의 반응산물의 양이 오히려 9% 가량 감소함을 확인하였다(Fig. 6). 이 현상은 기질인 cellobiose가 소멸된 이후 관찰된 것으로 보아 Celluclast가 더 이상 가수분해 및 당전이 활동을 할 수 없는 시점에서 cello-

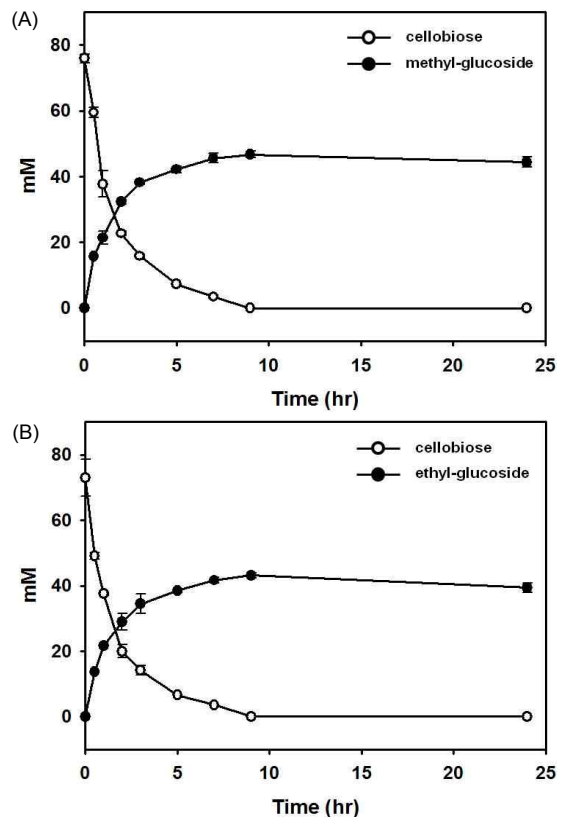


Fig. 6. Analysis of time course of methyl  $\beta$ -glucoside (A) and ethyl  $\beta$ -glucoside (B).

biose 대신 alkyl-glucoside를 기질로 사용하여 가수분해하는 결과로 사료된다. 또한, HPAEC 분석결과 cellobiose가 모두 분해된 9시간 반응 이후에도 미량의 glucose가 꾸준히 증가한 것으로 미루어 당전이 반응에 의해 생성되었던 alkyl-glucoside들이 다시 가수분해 됨을 알 수 있다. 또한 이 결과는 정제된 alkyl-glucoside를 Celluclast를 이용하여 가수분해 한 결과와 일치한다(Fig. 5).

본 연구를 통하여 cellulose 가수분해에 활용되는 cellulase 계열 상용 효소인 Celluclast를 alkyl- $\beta$ -glucoside 생산에 활용할 수 있음을 제시하였고, methyl- $\beta$ -glucoside와 ethyl- $\beta$ -glucoside의 생산에서 각각 65.3%와 59.0%의 수율을 확인하였다. 이와 유사한 결과로 Yan과 Liao(13)는 *Aspergillus niger*에서 유래한  $\beta$ -glucosidase를 이용한 당전이 반응에서 methyl- $\beta$ -glucoside와 ethyl- $\beta$ -glucoside를 각각 83%와 53%의 수율로 획득하였고, Kim 등(12)은 *Leuconostoc mesenteroides* 유래의 dextransucrase를 이용하여 최대 38%와 40%의 methyl- $\alpha$ -glucoside와 ethyl- $\alpha$ -glucoside를 얻은 바 있다. 흥미롭게도 dextransucrase의 경우 Celluclast가 상대적으로 반응에 취약한 butanol에 대하여 50%의 수율을 보였으며, 이와는 반대로 Celluclast가 반응할 수 있는 isopropanol에 대해서는 당전이 반응이 일어나지 않는 것으로 보고되었다(12). 이 결과들은 식품의 유효제, bio-surfactant 및 의약 소재로서의 개발 및 산업적 생산에 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

Alkyl-glucoside의 생산을 위하여 상용화 cellulase인 Celluclast의 당전이 반응을 사용하였다. 5가지 종류의 알코올을 acceptor molecule로 하여 반응을 살펴본 결과 methyl alcohol, ethyl alcohol, isopropanol 그리고 butanol에서 당전이 반응이 일어남을 확인하였다. 반응 수율이 높았던, methyl alcohol과 ethyl alcohol의 반응산물을 MALDI-TOF MS와 효소적인 방법을 사용하여 각각의 산물이 methyl  $\beta$ -D-glucopyranoside와 ethyl  $\beta$ -D-glucopyranoside임을 확인하였다. 시간대별 methyl-glucoside와 ethyl-glucoside의 생산량을 비교하여 본 결과 9시간에서 최대 생산 수율 65% (mol/mol)와 59%(mol/mol)를 각각 보였으며, 이후 반응은 진행되지 않았다. Cellulose의 당전이 반응으로 생성된 부산물인 glucose를 제거하기 위하여 고정화 효모 system을 도입하였고, 그 결과 glucose를 모두 제거할 수 있었다. 이상의 결과에서 Celluclast를 이용한 alkyl-glucoside의 생산을 성공적으로 수행하였고, 고정화 효모 system을 도입하여 친환경적으로 부산물을 제거하여 고순도의 ethyl-glucoside를 생산하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2011년 한림대학교 의료관광인재양성센터 3차년도 산학공동연구과제 지원으로 이루어졌으며, YMC-Korea의 기술지원을 받았습니다. 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Wang LX, Huang W. 2009. Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. *Curr Opin Chem Biol* 13: 592-600.
2. Bae HK, Lee SB, Park CS, Shim JH, Lee HY, Kim MJ, Baek JS, Roh HJ, Choi JH, Choe EO, Ahn DU, Park KH. 2002. Modification of ascorbic acid using transglycosylation activity of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase to enhance its oxidative stability. *J Agric Food Chem* 50: 3309-3316.
3. Lee SJ, Kim JC, Kim MJ, Kitaoka M, Park CS, Lee SY, Ra MJ, Moon TW, Robyt JF, Park KH. 1999. Transglycosylation of naringin by *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase to give glycosylated naringin. *J Agric Food Chem* 47: 3669-3674.
4. Li D, Park JH, Park JT, Park CS, Park KH. 2004. Biotechnological production of highly soluble daidzein glycosides using *Thermotoga maritima* maltosyltransferase. *J Agric Food Chem* 52: 2561-2567.
5. Park KH, Kim MJ, Lee HS, Han NS, Kim D, Robyt JF. 1998. Transglycosylation reactions of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase with acarbose and various acceptors. *Carbohydr Res* 313: 235-246.
6. Cho JS, Yoo SS, Cheong TK, Kim MJ, Kim Y, Park KH. 2000. Transglycosylation of neohesperidin dihydrochalcone by *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase. *J Agric Food Chem* 48: 152-154.
7. Li D, Roh SA, Shim JH, Mikami B, Baik MY, Park CS, Park KH. 2005. Glycosylation of genistin into soluble inclusion complex form of cyclic glucans by enzymatic modification. *J Agric Food Chem* 53: 6516-6524.
8. Vandamme EJ, Soetaert W. 1995. Biotechnical modification of carbohydrates. *FEMS Microbiol Rev* 16: 163-186.
9. Thiem J. 1995. Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry. *FEMS Microbiol Rev* 16: 193-211.
10. Vic G, Biton J, Le Beller D, Michel JM, Thomas D. 1995. Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse hydrolysis reaction using almond- $\beta$ -D-glucosidase. *Biotechnol Bioeng* 46: 109-116.
11. Fischer L, Bromann R, Wagner F. 1995. Enantioselective synthesis of several 1-O- $\beta$ -D-glucoconjugates using almond  $\beta$ -glucosidase (E.C. 3.2.1.21). *Biotechnol Lett* 17: 1169-1174.
12. Kim YM, Kim BH, Ahn JS, Kim GE, Jin SD, Nguyen TH, Kim D. 2009. Enzymatic synthesis of alkyl glucosides using *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Biotechnol Lett* 31: 1433-1438.
13. Yan TR, Liao JC. 1998. Synthesis of alkyl  $\beta$ -glucosides from cellobiose with *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase II. *Biotechnol Lett* 20: 653-657.
14. Yan TR, Lin YH, Lin CL. 1998. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase II with high hydrolysis and transglycosylation activities from *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem* 46: 431-437.
15. Andrić P, Meyer AS, Jensen PA, Dam-Johansen K. 2010.

- Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotechnol* 160: 280-297.
16. Liu TY, Castelfranco P. 1970. The biosynthesis of ethyl- $\beta$ -glucoside in extracts of pea seedlings. *Plant Physiol* 45: 424-428.
  17. Merino ST, Cherry J. 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108: 95-120.
  18. Garcia-Aparicio MP, Ballesteros I, González A, Oliva JM, Ballesteros M, Negro MJ. 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* 129: 278-288.
  19. Rosgaard L, Andric P, Dam-Johansen K, Pedersen S, Meyer AS. 2007. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Appl Biochem Biotechnol* 143: 27-40.
  20. Rosgaard L, Pedersen S, Meyer AS. 2007. Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw. *Appl Biochem Biotechnol* 143: 284-296.
  21. Zhang YW, Prabhu P, Lee JK. 2010. Alginate immobilization of recombinant *Escherichia coli* whole cells harboring L-arabinose isomerase for L-ribulose production. *Bioproc Biosyst Eng* 33: 741-748.
  22. Baek JS, Kim HY, Abbott TP, Moon TW, Lee SB, Park CS, Park KH. 2003. Acarviosine-simmondsin, a novel compound obtained from acarviosine-glucose and simmondsin by *Thermus* maltogenic amylase and its *in vivo* effect on food intake and hyperglycemia. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 532-539.
  23. Shim JH, Park JT, Hong JS, Kim KW, Kim MJ, Auh JH, Kim YW, Park CS, Boos W, Kim JW, Park KH. 2009. Role of maltogenic amylase and pullulanase in maltodextrin and glycogen metabolism of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* 191: 4835-4844.
  24. Lirdprapamongkol K, Svasti J. 2000. Alkyl glucoside synthesis using Thai rosewood  $\beta$ -glucosidase. *Biotechnol Lett* 22: 1889-1894.

(2012년 5월 23일 접수; 2012년 7월 13일 채택)