

## Alkaline Protease를 이용한 Corn Gluten Meal의 효소가수분해 반응특성 및 반응속도론적 분석

김 성 진 · †이 은 규 · \*남 충 희

한양대학교 화학공학과, \*(주)두산종합식품 기술연구소

## Reaction Characteristics and Kinetic Analysis of Enzymatic Hydrolysis of Corn Gluten Meal Using Alkaline Protease

Sung-Jin Kim, Eun-Kyu Lee<sup>†</sup> and Choong-Hee Nam<sup>\*</sup>

Department of Chemical Engineering

Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

<sup>\*</sup>Doosan Foods Co., Technology Research Institute

### ABSTRACT

Dry corn gluten meal of 70% protein content was enzymatically hydrolyzed by alkaline protease in a pH-stat reactor. Such process variables as temperature, pH, and enzyme-to-substrate ratio were varied, and at each condition degree of hydrolysis was monitored and calculated. The ultimate degree of hydrolysis, which ranged between 25 and 28% based on gluten protein mass, was not significantly affected by the process variables. However, 50°C and pH 9-10 appeared optimum. Kinetic analysis indicated enzyme deactivation was negligible during the hydrolysis, and the experimental data were near perfectly fitted to the model kinetic equation which was modified after neglecting enzyme deactivation term. The enzyme reaction was 100x scaled up and basically the same hydrolysis performance was resulted. Amino acid analysis showed the hydrolyzate was relatively rich in glutamine/glutamic acid, leucine, and alanine at 19.6, 16.1, and 12.3 mole %, respectively.

### 서 론

단백질 가수분해액은 soup, 과일쥬스, 청량음료 등 여러 종류의 음식물에 단백질을 대체하는 영양보강물로 이용될 수 있다(1-3) 그 이유는 단백질과는 달리 가수분해 산물인 아미노산 및 peptide류는 낮은 pH나 가열공정 등에서 용액내에 비교적 안정하게 잔존할 수 있기 때문이다. 단백질 가수분해반응

은 산, 알칼리, 또는 효소에 의해 일어날 수 있고, 이 중 효소반응은 단백질내의 영양성, 기능성 등을 보존하는 면에서 최적의 공정이라 할 수 있다. Alkaline protease는 casein, hemoglobin, albumin, whey, fish meal, gelatin 등의 동물성단백질뿐 아니라 barley, cotton seed, chick pea flour, soybean, gluten meal 등의 식물성단백질의 가수분해반응에 널리 이용되어 왔다. 또 corn gluten meal은 비교적 단백질함량이 높고 전분분해공정의 부산물로서 가격이 저렴하므로 주로 동물사료용으로 많이 쓰이고 있

† Corresponding Author

다. 따라서 효율적인 분해공정을 통해 corn gluten meal내의 단백질을 고영양성, 신기능성이고 soluble한 peptide류로 변환시키는 공정에 대한 연구가 진행되어 왔다(4).

Corn gluten meal과 같은 불용성(insoluble) 단백질의 효소분해반응은 그 mechanism이 복잡하다. 그 이유로는 단백질 내의 peptide 결합들의 configuration 등이 서로 다르고 따라서 그들과 효소의 affinity 또한 각각 다르기 때문이다(5). 또한 반응 mechanism도 불용성단백질내부에 효소의 흡착, 효소에 의한 부분적 분해, 단백질의 emulsification, 용해된 peptide류의 추가분해 등의 여러 단계를 거치는 것으로 알려졌으며(6), 이 과정에서 효소의 deactivation, 기질에 의한 효소억제작용, 반응생성물인 peptide류 및 아미노산에 의한 억제작용, triglycerides, phospholipids, sitosterol 등으로 대표되는 비단백질류에 의한 억제작용(7) 등이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 corn gluten meal의 alkaline protease를 이용한 효소가수분해반응에 있어서, 반응척도 및 평가방법으로서 가수분해도를 적용하여 주요 공정인자들인 pH, 온도, 효소대 기질의 질량비율 등의 적정화를 꾀하였고, 반응종료의 주된 원인으로 생각되어 왔던 효소의 deactivation 여부에 초점을 맞추어 반응속도론적 고찰을 한 후, 모델방정식에 실험데이터를 적용하여 여러 kinetic parameter의 값을 계산제시하였다. 또한 이 효소반응을 100배 scale-up하여 반응의 scale-up ability를 확인하고 가수분해액의 아미노산분석을 통해 아미노산의 분포를 조사하였다.

## 재료 및 방법

건조된 corn gluten meal은 (주)두산종합식품에서 제공받았다. 이것은 옥수수 전분 분해공정에서의 부산물로서 단백질함유량이 건조질량기준으로 약 70%이다(8). 단백질분해효소로는 alkaline protease (APL 440™, Solvay Enzymes, Inc., Elkhart, IN, USA)를 이용하였다. 이 효소는 용액형태의 bacterial alkaline protease (E.C.3.4.21)이며 *Bacillus licheniformis*에서 생성되는 serine endopeptidase로서 단백질 내부에 위치한 peptide 결합을 분해하는 반응의 촉매역할을 한다(9). 이 alkaline protease 용액 1ml 내에 존재하는 효소질량은 Bradford protein assay에 의해 약 20mg으로 나타났다(10). 효

소가수분해반응은 1 liter beaker 내에서 진행시켰으며 pH 자동조절기(model 5652-00, Cole-Parmer Co., Chicago, IL, U. S. A)를 이용하여 pH-stat을 유지하였고 적정용염기로는 1N NaOH를 사용하였다. 반응 pH는 8.0, 9.0, 10.0에서 반응온도는 40, 50, 60°C에서 변화시켰으며, corn gluten meal의 농도는 63~139g 건조질량/L, 효소대 기질의 질량비는 0.83~2.86mg 효소/g 단백질의 범위 내에서 변화시켰다.

가수분해도(degree of hydrolysis, DH)는 단백질 단위질량내 존재하는 peptide 결합의 수에 대하여 가수분해된 peptide 결합의 수의 비율로서 정의될 수 있다(11).

$$DH = \frac{\text{Number of Peptide Bonds Cleaved}}{\text{Total Number of Peptide Bonds}} \quad (1)$$

단백질 단위질량내에 존재하는 peptide 결합의 수는 아미노산조성으로부터 계산될 수 있으나 대부분의 food protein의 경우 아미노산의 평균분자량이 약 125g/mole이므로 8meq/g protein으로 나타낼 수 있다. 또 peptide 결합분해시 유리되는 아미노기와 NaOH에 의해 공급되는 하이드록실기가 1:1반응을 하므로 적정용염기의 사용량과 normality로부터 분해된 peptide 결합의 수를 계산할 수 있다. 따라서 DH는 아래의 식(2)로부터 얻을 수 있다.

$$DH = \frac{B \cdot N_B}{M} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{1}{n_{tot}} \quad (2)$$

여기서 B는 NaOH의 사용량(ml), NB는 NaOH의 normality, M은 단백질질량 (g),  $n_{tot}$ 는 단백질 단위질량내의 peptide 결합의 총수, 그리고  $\alpha$ 는 단백질의 해리도(degree of dissociation)이며 pH와 pK에 의해 식(3)과 같이 나타난다.

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (3)$$

Soy protein 가수분해시 pH, pK, 온도의 변화에 따른  $\alpha$ 값의 데이터가 발표되었으며(12), 본 연구에서도 이 데이터를 이용하였다.

초기반응속도는 시간에 따른 가수분해도의 변화를 각 데이터점에서 계산한 후 그 값들이 일정하게 유지되는 부분까지의 평균속도로 나타내었다.

효소반응 종료후 용액여과를 위하여 CaCl<sub>2</sub> 1.0% (w/v), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5% (w/v)을 첨가하여 난여과성 미립자들의 응집을 유도한 후 filter aid (Per-

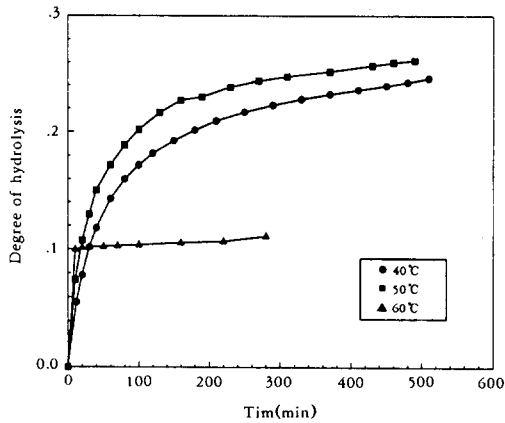


Fig. 1. Effect of Hydrolysis Temperature ( $s_0=84g/l$ ,  $e_0=80mg/l$ ,  $pH=9$ ).

liteTM) 2.0% (w/v)을 첨가하고 30분간 충분히 교반한 후 진공여과하였다. 여과액내의 아미노산 함량은 기초과학지원센터내 Life Science Lab에서 아미노산분석법에 의해 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 온도 및 pH의 영향

효소반응에서 온도의 영향을 평가하기 위해 pH를 9.0으로 일정하게 한 후 온도를 40, 50, 60°C로 변화시켰다. 이 때의 초기 기질단백질의 농도( $s_0$ )는 84 g/l, 초기 효소농도 ( $e_0$ )는 80 mg/l이었다. Fig. 1은 각각의 온도에서 시간에 따른 가수분해도 변화를 보여준다. 초기 10분간은 60°C에서 가장 높은 반응속도를 보여주지만 그 후로는 가수분해도의 변화가 거의 없는 것으로 미루어 alkaline protease 효소가 60°C에서 비교적 빨리 denaturation이 되었다고 볼 수 있다. 40°C에 비해 50°C에서 높은 반응속도를 관찰할 수 있었고, 이같은 온도상승에 따른 효소반응속도의 증가효과는 Arrhenius식으로 설명될 수 있다(13).

Fig. 2는 50°C 일정한 온도에서 pH 8, 9, 10에서의 가수분해도의 변화profile을 보여준다 (효소대 기질 비율은 Fig. 1과 동일함). pH 8에 비해 pH 9와 10에서 보다 높은 반응속도 및 가수분해도를 얻을 수 있었고, pH 9보다는 10에서 반응속도는 높으나 최종 (ultimate) 가수분해도는 큰 차이가 없었다. Fig. 1과 2의 가수분해 profile에서 보듯이 가수분해 속도는 시간에 따라 감소하다가 최종가수분해도부근

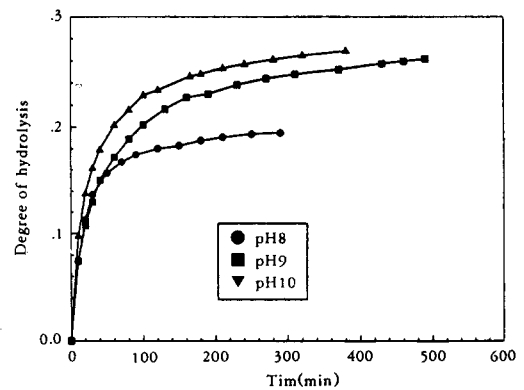


Fig. 2. Effect of Hydrolysis pH ( $s_0=84g/l$ ,  $e_0=80mg/l$ , temperature = 50°C).

에서 반응이 멎음을 볼 수 있다. 각 조건에서의 최종 가수분해도는 약간씩 차이가 나지만 약 25~28%이었다. 이 값은 corn gluten meal질량의 70%를 차지하는 단백질함량기준이므로 corn gluten meal전체질량기준으로는 약 17~20%라 할 수 있다. 이러한 가수분해도는 전체 peptide 결합수 중 serine endopeptidase에 specific한 peptide 결합수의 비중이 그리 높지 않음을 나타낸다. 그러나 이미 발표된 alkaline protease를 이용한 다른 food protein의 가수분해도(12), 즉 casein (약 15%), maize isolate (약 14%), soy isolate (약 12%), wheat gluten (약 11%) 등과 비교시 다소 높은 값이다.

#### 효소대 기질비율의 영향

효소반응에 있어서 효소대 기질의 질량비율, 즉  $e_0/s_0$ 는 기질의 초기농도, 즉  $s_0$ 와 함께 주요한 변수로 작용한다. 대부분의 food protein가수분해시  $s_0$ 는 6~12%로 하므로, 본 연구에서도 단백질기준으로  $s_0$ 를 4.4~9.7% 범위에서  $e_0/s_0$ 를 0.83~2.86mg 효소/g 단백질 범위에서 변화시키며 가수분해 profile의 변화를 관찰하였다. Fig. 3에서 보듯이 최종가수분해도는 25~28%로 별 차이는 없었지만 초기반응속도는  $e_0/s_0$ 에 비례함을, 따라서 어떤 최종가수분해도에 이르기까지 걸리는 시간은  $e_0/s_0$ 에 반비례함을 볼 수 있다. 효소농도를 80mg/l 기준에서 2배, 3배 증가시키더라도 초기반응속도는 각각 1.26배, 1.40배만 증가하였다. 이는 alkaline protease 효소와 corn gluten meal내의 단백질기질이 매우 높은 친화도 (affinity)를 갖고 반응함을 보여준다.

반응후반에는  $e_0/s_0$ 에 관계없이 반응속도가 점차

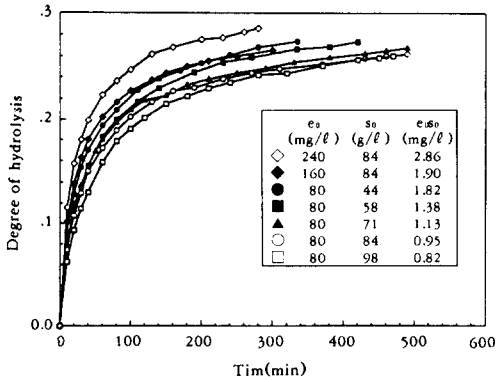


Fig. 3. Hydrolysis Profiles for Various Enzyme-to-Substrate Ratios.(pH=9, Temperature = 50°C).

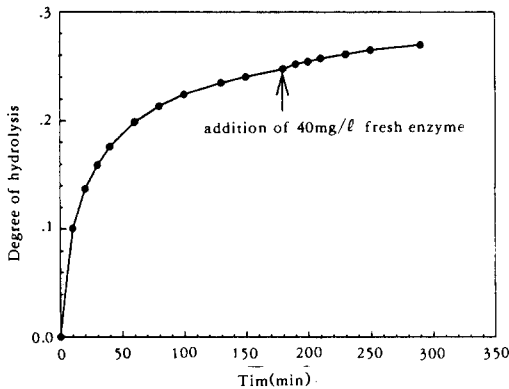


Fig. 4. Effect of Addition of Fresh Enzyme During Hydrolysis. ( $s_0=84g/l$ ,  $e_0=80mg/l$ , temperature = 50°C).

감소하여 pseudo-steady한 값에 도달하였다. 이는 기질내 enzyme-specific한 peptide bond의 소진 (depletion), 가수분해반응으로 인해 solubilize된 단백질이나 peptides류에 의한 product inhibition, 효소의 deactivation 등의 복합적인 영향으로 볼 수 있다. 본 연구에서는 특히 substrate depletion과 enzyme deactivation여부에 초점을 맞추어 속도론적 분석을 하였다.

Kinetic Analysis

Fig. 4는 반응후반에 fresh enzyme를 추가로 첨가하였을 때의 가수분해도 변화를 나타낸 그래프이다. 온도 50°C, pH 9,  $s_0 = 84g/l$ ,  $e_0=80mg/l$ 에서 반응을 진행시킨 후 180분 후 가수분해도가

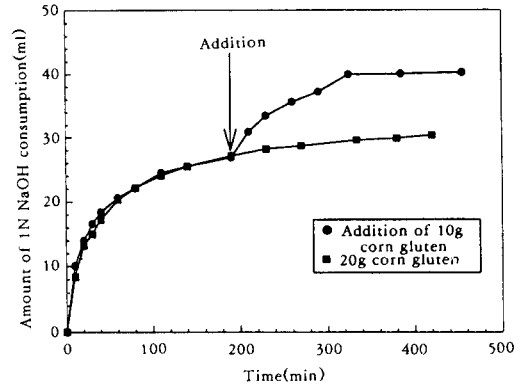


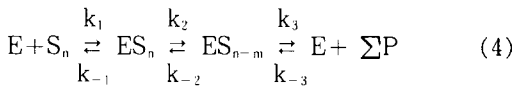
Fig. 5. Effect of Addition of Fresh Substrate During Hydrolysis. ( $e_0=80mg/l$ , pH=9, temperature = 50°C).

pseudo-steady state에 진입할 때 초기효소량의 절반인 40mg/l를 추가로 투입하였다. 그래프에서 보듯이 단백질기질의 가수분해도를 향상시키기 위해 반응후반에 효소를 추가투입하는 것은 별 이득이 되지 않았다. 이 결과는 bacterial alkaline protease를 이용한 chick pea flour의 가수분해시, 반응 중간에 효소를 추가투입하여 최종가수분해도를 약간 (약 15.5%에서 약 16.5%로) 상승시켰다는 Moreno와 Cuadrado의 실험결과(5)와 상충된 결과였다. 그러나 fungal protease를 이용한 soy protein의 solubilization때의 실험결과와는(6) 일치하였다. 이러한 상반된 결과는 단백질기질과 효소간의 affinity, 추가효소투입시간(반응중반 또는 후반) 등에 기인한 것으로 생각된다. 본 실험결과에 의하면 반응 후반에는 이미 기질내의 alkaline protease에 specific한 peptide bond가 소진되었음을 보여준다.

이번에는 효소의 deactivation여부를 확인하기 위하여 20g corn gluten meal을 가수분해할 때, 반응 도중에 10g의 fresh한 corn gluten meal을 추가투입한 후의 NaOH의 소모량과 그렇지 않았을 때의 소모량을 비교하여 보았다. Fig. 5에서 보듯이 fresh substrate를 추가투입시 즉시 NaOH 소모량이 현저하게 증가하는 것으로 보아 추가로 투입된 기질에 대한 가수분해가 계속 진행됨을 알 수 있고, 따라서 대부분의 효소는 아직도 active하다는 것을 유추할 수 있다. 또 반응도중에 10g의 기질을 추가 투입한 경우에도 최종가수분해도는 초기부터 30g의 기질을 사용한 경우와 같았다(data not shown). 따라서 가수분해생성물에 의한 효소반응 억제(inhibi-

tion) 효과도 미미함을 알 수 있다. 이러한 결과는 malt protease에 의한 wort 가수분해시 가수분해도는 substrate depletion보다 효소활성저하에 의해 제약을 받는다는 Sopanen et al.의 관찰(14), neutral protease에 의한 barley protein의 분해반응시 protease효소가 이미 solubilize된 단백질과 결합함으로써 반응이 진행됨에 따라 전체적으로 효소활성이 억제된다는 Markovic et al.의 주장(15)을 반증하는 것이며, 효소반응속도는 기질의 물리적 형태, 즉 soluble한가 insoluble한가에 무관하게 항상 기질의 농도에 비례한다는 Schurr와 McLaren의 열역학적 유추(16)와 일치함을 나타내는 것이다. 따라서 적정온도와 pH 에서의 alkaline protease 반응시 효소의 deactivation 영향은 무시할 수 있다는 결론을 도출하였다.

효소반응의 kinetic parameter의 값을 구하기 위해 위의 실험결과를 고전적인 효소반응속도론적 모델식에 적용시켜 보았다. 가역적인 단일기질의 효소반응은 아래의 식(4)의 mechanism에 의해 표현할 수 있다(17).



여기에서 S의 첨자 n, n-m 등은 단백질 기질 내의 peptide chain의 길이를 나타내는 것이고 P는 반응생성물인 여러 길이의 peptide의 질량합이다. 이 mechanism에 의해 시간에 따른 가수분해도, 또는 반응물 생성속도를 나타내면(6)

$$\frac{d(\sum P)}{dt} = \frac{(V_s/K_s)[s_0 - (1 + V_p K_s/V_s K_p) \sum P] \exp(-k_d t)}{1 + s_0/K_s + (1/K_p - 1/K_s) \sum P} \quad (5)$$

여기서  $V_s$ ,  $V_p$ ,  $K_s$ ,  $K_p$ 는 각각 lumped forward reaction constant(mg/ml · min), lumped backward reaction constant(mg/ml · min), lumped Michaelis-Menten constant(mg/ml), lumped product inhibition constant (mg/ml)로서 아래의 식들로 나타낼 수 있고  $k_d$ 는 enzyme deactivation rate constant이다.

$$V_s = k_2 k_3 e_0 / (k_1 + k_2 + k_3) \quad (6)$$

$$V_p = k_{-1} k_{-2} e_0 / (k_{-1} + k_2 + k_{-2}) \quad (7)$$

$$K_s = (k_{-1} k_{-2} + k_1 k_3 + k_2 k_3) / k_1 (k_1 + k_2 + k_3) \quad (8)$$

$$K_p = (k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3) / k_{-3} (k_{-1} + k_2 + k_{-2}) \quad (9)$$

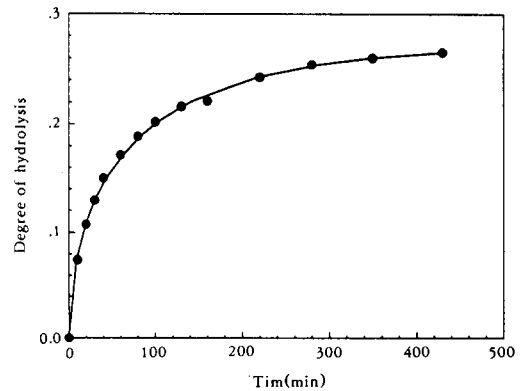


Fig. 6. Comparison of Experimental Profile(●) with That Predicted by Eq(11)(-).

Table 1. Value of Kinetic Parameters in Eq(10) Estimated from Experimental Data Using Nonlinear Regression Analysis. (Temp=50°C, pH=9.0,  $s_0=84g/l$ ,  $e_0=80mg/l$ ).

Parameter	Value
$V_s$	4.386
$V_p$	0.106
$K_s$	7.866
$K_p$	0.071

Fig. 5의 결과에 따라 enzyme deactivation을 무시하면 식(5)는 아래의 식(10)으로 변형될 수 있다.

$$\frac{d(\sum P)}{dt} = \frac{(V_s/K_s)[S_0 - (1 + V_p K_s/V_s K_p) \sum P]}{1 + S_0/K_s + (1/K_p - 1/K_s) \sum P} \quad (10)$$

실험데이터를 이용하여 식(10)에 있는 parameter들을 Marquardt nonlinear regression 분석법을 통해 결정하였고 그 결과를 Table 1에 요약하였다. Backward reaction rate의 lumped된 값이 forward reaction rate의 그것에 비해 약 1/40로 매우 작음을 알 수 있고 product inhibition효과 역시 미미함을 알 수 있다. 위에서 구한 parameter의 값을 식(10)에 대입한 결과 아래의 식(11)을 얻을 수 있었다.

$$\frac{d(\sum P)}{dt} = \frac{0.558(S_0 - 3.669 \sum P)}{1 + 0.127 S_0 + 13.960 \sum P} \quad (11)$$

Fig. 6은 실험을 통해 얻은 가수분해 profile과 식(11)을 적용한 profile을 비교한 그래프이다. 그림에

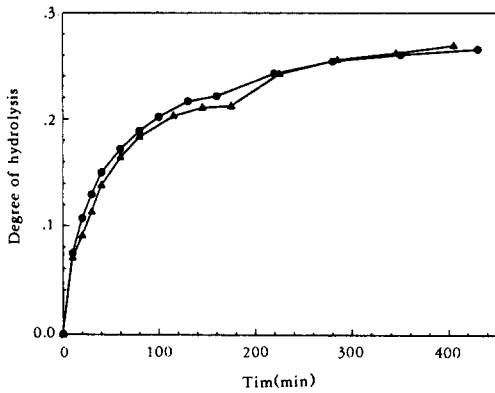


Fig. 7. 100× Scale-up of Hydrolysis. ((▲)CG 3kg, Alkaline Protease 2g in DW 23 l (●)CG 30g, Alkaline Protease 20mg in DW 230ml pH=9, temperature = 50°C).

Table 2. Amino Acid Distribution in Corn Gluten Hydrolyzate Filtrate.

Amino acid	mg/g protein	mol %
CYA <sup>1</sup>	0.409	5.11
ASX <sup>2</sup>	0.493	5.66
GLX <sup>3</sup>	1.899	19.55
SER	0.361	5.20
GLY	0.239	4.83
HIS	0.141	1.38
ARG	0.243	2.10
THR	0.241	3.06
ALA	0.758	12.89
PRO	0.765	10.07
TYR	0.263	2.20
VAL	0.396	5.13
MET	0.144	1.46
ILE	0.365	4.21
LEU	1.397	16.14
PHE	0.484	4.44
TRP	0.051	0.38
LYS	0.126	1.31

서 보듯이 두 profile이 거의 완벽하게 일치함으로 본 가수분해 반응에서의 model equation과 그에 상응한 가정 등이 합당함을 알 수 있었다.

반응의 Scale-up 및 가수분해액의 아미노산 조성 Fig. 7는 효소가수분해반응을 100× scale-up하

여 1×때와 가수분해도 profile을 비교한 그래프이다. 1×에는 corn gluten meal 30g을 물 230ml에 slurry시킨 후 alkaline protease 20mg을 사용하였고, 100×에는 3kg의 corn gluten meal, 23 l의 물, 2g의 alkaline protease를 사용하였다. 온도와 pH는 각각 50°C와 9였다. 그래프에서 보듯이 반응 초기에서 약간의 차이가 있었으나 전체적인 가수분해 profile 및 최종가수분해도는 거의 일치하였다. 따라서 본 효소반응은 매우 용이하게 scale-up 될 수 있음을 알 수 있다.

100× 실험에서 얻은 가수분해액은 CaCl<sub>2</sub> 1.0% (w/v), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5% (w/v)을 첨가한 후 2% (w/v)의 Perlite™을 filter aid로 이용하여 filter press를 통해 여과하였다. 여과액의 아미노산함량을 Table 2에 나타냈다. 여기서 아미노산의 함량은 dry corn gluten meal에 포함된 단백질 1g에 해당되는 각 아미노산의 질량으로 표시했고 아미노산의 조성은 mol%로 표기했다. 그 결과 glutamine 및 glutamic acid의 함량이 19.55mol%로 가장 높았고 leucine, alanine, proline 등이 각각 16.14, 12.89, 10.07mol%로 비교적 높은 농도를 보여주었다. 이같은 아미노산 조성은 미생물발효용 complex nitrogen substrate로 생산판매되고 있는 Hydrolyzed Corn Gluten™(18)의 아미노산조성과(glutamine 및 glutamic acid, 19.73; leucine, 15.88; proline, 9.63; alanine, 8.81% (w/w)) 매우 흡사하였고, 따라서 이 가수분해액을 직접 미생물발효용 질소원으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

bacterial alkaline protease를 이용한 corn gluten meal의 효소가수분해시 pH, 온도, 효소대 기질의 질량비율 등에 따른 반응특성 및 반응의 적정화를 꾀하였고, 효소의 deactivation여부에 초점을 맞추어 효소반응속도론적 방정식을 제안조사하였다. 그 결과, 50°C, pH 9~10에서 가장 높은 가수분해도를 나타내었고 e<sub>0</sub>/s<sub>0</sub>가 높을수록 반응속도 및 최종 가수분해도가 증가하였다. 최종가수분해도는 gluten meal전체질량기준으로 17~20%, gluten meal내의 단백질질량기준으로 25~28%였다. 반응후반에서의 반응속도감소의 주된 원인은 기질소진(substrate depletion)이며 이때 enzyme deactivation 및 product inhibition의 영향은 미미한 것으로 확인되었다. 효소 deactivation항을 무시하여 변형시킨 model equa-

tion에 의해 이 효소반응에 해당하는 여러 kinetic parameter들의 값을 계산분석한 결과 product inhibition 효과가 미미함을 확인하였다. 변형된 kinetic equation과 실험적으로 얻은 가수분해 데이터는 거의 완벽하게 일치하였다. 효소반응을  $100\times$  scale-up한 결과 가수분해 profile 및 가수분해도는  $1\times$ 와 비교시 거의 일치하였으므로 이 효소반응이 용이하게 scale-up될 수 있음을 확인하였고, 아미노산분석 결과 가수분해액을 미생물발효기질용 질소원으로 사용할 수 있음을 제시하였다.

### 감 사

본 연구는 한양대학교 교내 학술연구비에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다. 또 scale-up 실험에 협조해 주신 (주)두산종합식품 기술연구소에도 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. D. K. Salunke, and H. R. Bolin(1972), *Food Prod. Develop.*, **6**, 84.
2. V. H. Holsinger, L. P. Posati, D. D. DeVilbiss and M. J. Pallansch(1973), *Food Technol.*, **27** (2), 59.
3. K. Predergast(1974), *Food Trade Rev.*, **1**, 14.
4. Y. V. Wu, J. W. King and K. Warner(1994), *Proteins*, **71**(3), 217~219.
5. M. C. M. Moreno and V. F. Cuadrado(1993), *Process Biochemistry*, **28**, 481~490.
6. A. Constantinides and B. Adu-Amankwa (1980), *Biotech. Bioeng.*, **22**, 1543~1565.
7. A. M. Nash, A. C. Eldridge and W. J. Wolf (1967), *J. Agri. Food Chem.*, **15**, 102.
8. (주)두산종합식품 “전분, 전분당, 옥분” 기술자료(1993).
9. Solvay Enzymes Products Bulletin(1992), Elkhart, IN, U. S. A.
10. 박동하(1995), 석사학위논문, 한양대학교 화학공학과.
11. J. Adler-Nissen(1982), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **32**, 138.
12. Novo Industri A/S, Alcalase calidad alimentaria. B-318(1988), Bagsvaerd, Denmark.
13. J. Bailey and D. Ollis(1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., p132~133.
14. T. Sopanen, P. Takkinen, J. Mikola and T-M. Enari (1980), *J. Inst. Brew.*, **86**, 211.
15. I. Markovic, V. Topolovec, V. Maric and V. Johanides(1988), *Biotech. Bioeng.*, **32**, 18.
16. J. M. Schurr and A.D. McLaren(1965), *Enzymologia*, **29**, 315.
17. J. B. S. Haldane(1930), *Enzymes*, Longman, London.
18. Sheffield Products Technical Manual(1989), Norwich, NY, U. S. A.