

## Cyclodextrin Glucanotransferase의 고정화와 당전이 스테비오사이드 제조에 관련된 반응 특성

인만진\* · 김동청 · 채희정 · 최경석 · 김민홍  
(주)미원 중앙연구소

**Immobilization of Cyclodextrin Glucanotransferase and Its Reaction Characteristics Regarding Transglucosylated Stevioside Production. Man-Jin In\*, Dong Chung Kim, Hee Jeong Chae, Kyung Seok Choi and Min-Hong Kim. R&D Center, Miwon Co. Ltd., Ichon 467-810, Korea-**  
For the continuous production of transglucosylated steviosides, cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus macerans* was immobilized onto Diaion™ HPA 75 (styrene-divinylbenzene resin) that was screened from ion exchange resins, synthetic adsorbents and chitosan derivatives. The parameters influencing enzyme immobilization were examined in order to maximize the activity of immobilized enzyme. The optimum conditions for immobilization turned out to be: contact time 2 hr at 30°C, pH 6~9, and enzyme loading 20 mg protein/g resin at 4.4 Os/Kg as osmolarity. Competing with other molecules having low molecular weight, enzyme was immobilized reversibly. The activity of immobilized enzyme was as high as 180 U/g resin when the diafiltrated solution of stock enzyme was used. The optimum conditions for transglucosylation were as follows: pH 6.0, temperature 50°C, 30% substrate solution composed of 15% stevioside mixture and 15% dextrin of which value of dextrose equivalent was about 9.0.

스테비오사이드(C13-O-β-sophorosyl-C19-O-β-D-glucosylsteviol)는 국화과 식물인 *Stevia rebaudiana* BERTONI에서 유래하는 배당체로 난소화성이며 열에 강한 고감미(감미도가 설탕의 약 150-200배)의 천연감미료이다. 그러나 스테비오사이드는 약간 쓴맛, 짠 맛 그리고 뒷맛이 산뜻하지 못한 단점을 가지고 있다. 따라서 이런 스테비오사이드의 단점을 개선하고 동시에 감미도를 향상시키려는 많은 연구가 진행되어 왔다. 일반적인 개선방법은 포도당과 같은 당류와 단순히 혼합하여 물리적으로 개선하는 방법과 당전이 활성이 있는 효소를 이용하여 스테비오사이드에 당을 결합시키는 효소공학적인 방법으로 구분된다(생성물을 당전이 스테비오사이드라고 한다)(1). 이때 사용되는 효소로는 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)가 대표적이며(2-3), 그 외에도 β-galactosidase, β-fructofuranosidase, α-galactosidase 등을 이용하여 단당류를 전이시켜 당전이 스테비오사이드를 제조하는 방법이 보고되어 있다(4-6). CGTase에 의하여 생성되는 당전이 스테비오사이드에 관한 Fukunaga 등의 연구에 의하면, 스테비오사이드의 13번 탄소에 결합된 포도당 잔기에 포도당 1~3분자가 전이되면 감미질과 감미도가 향상되었다(7). 더욱이 CGTase는 포도당 4번 탄소의 -OH기에 선택성이 뛰어나 1,4-α-

transglucosylation 반응을 효율적으로 촉매하는 것이 알려져 있으며(8), 산업적으로 당전이 스테비오사이드는 주로 유리효소(대부분 CGTase)를 이용하여 회분식으로 제조되고 있다. CGTase는 비교적 고가의 효소로 경제적인 측면에서 고정화 CGTase를 이용하는 제조방법이 요망되나, 고정화 CGTase에 관한 연구는 주로 전분으로부터 cyclodextrin을 합성하는 것에 관련된 것이 보고되었을 뿐(9, 10) 생물 반응기에서 연속적으로 스테비오사이드에 포도당을 전이시키기 위한 연구는 미미한 실정이다. 다만 최근에 생전분을 당공여체로 이용한 CGTase의 당전이 반응기작에 관한 연구가 보고된 바 있다(11, 12).

본 연구에서는 생물 반응기에서 연속적으로 당전이 스테비오사이드를 제조하기 위하여 먼저 CGTase의 고정화에 관한 연구를 수행하였다. 고정화에 적합한 담체를 선별하여 고정화 조건을 조사하였으며, 고정화 효소의 당전이 반응에 영향을 주는 변수들을 연구하여 최적화하였다.

### 재료 및 방법

#### 재 료

당전이 효소는 *Bacillus macerans* 유래의 산업용 CGTase(Amano사, Japan)를, 당공여체와 수용체는 산업용 텍스트린(Roquette사, France)과 스테비오사이드 혼합물(태평양, 한국)를 각각 사용하였다. 효소액의 탈염과 농축은 Prep/Scale™-TFF cartridge(Millipore사, USA) 환외여과막(MWCO 10,000)과 Masterflex 정량

\*Corresponding author

Tel. 82-336-39-2000, Fax. 336-638-1500

Key words: Cyclodextrin glucanotransferase, Immobilization, Transglucosylated steviosides

펌프(Cole Parmer사, USA)를 이용하여 수행하였다. 효소 고정화는 항온 진탕기(비전과학, 한국) 또는 Janke & Kunkel사(독일)의 병렬형 교반기(model RER S1)를, osmolarity의 측정은 Advanced Instruments사(Norwood, Mass., USA)의 Advanced Osmometer(model 3D3)를 이용하였다.

### 효소활성 측정

CGTase의 활성은 스테비오사이드와 덱스트란을 기질로 하여 전이활성을 측정하였다. 50 mM 인산완충액(pH 6.0)에 부분정제된 스테비오사이드 혼합물(stevioside 90%, rebaudioside A 10% 함유) 7%(w/v)와 덱스트린(DE=9) 14%(w/v)를 용해한 기질용액 50 ml를 47°C에서 10분 예열한 후 조효소액 혹은 고정화 효소를 넣고 150 rpm으로 진탕하여 30분 동안 반응시켰다. Microwave oven으로 3분간 가열하여 반응을 정지시키고 (13) HPLC로 스테비오사이드를 분석하였다. 효소활성 1 단위(unit)는 1 분당 1  $\mu$ mole의 스테비오사이드를 감소시키는 효소량으로 정의하였다.

### 단백질 정량

조효소액의 단백질의 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준물질로 하여 Bradford의 방법(14)으로 측정하였으며, 담체에 고정화된 단백질량은 고정화 전, 후 조효소액의 단백질 농도를 측정하여 계산하였다.

### 분석방법

효소반응으로 생성된 당전이 스테비오사이드의 분석은 HPLC(Waters사, Milford, MA)를 사용하여 실시하였고, column은 Econosphere NH<sub>2</sub>(Alltech사, Deerfield, IL), 용매는 acetonitrile과 물(70:30)의 혼합용액, flow rate는 0.8 ml/min이었고, UV detector(214 nm)로 검출하였다.

### 효소 고정화

효소 고정화는 인 등의 방법(15)을 부분적으로 변형하여 실시하였다. 담체는 증류수로 충분히 세척한 후 흡입 플라스크로 여과하여 수분을 제거한 상태에서 모든 고정화 실험에 사용하였다. 효소 고정화는 담체 2 g과 조효소액을 혼합하여 30°C에서 150 rpm으로 2시간동안 교반하여 실시하였다. 고정화 실시 후 담체와 조효소액을 분리하여 담체는 증류수로 수세하여 고정화된 효소의 활성을, 조효소액에서는 잔존 단백질 함량과 효소활성을 각각 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 고정화 담체의 선별

여러가지 고정화 방법 중에서 간단하고 다량의 고정화 효소 제조가 용이한 방법인 흡착법 혹은 이온교환법으로 고정화하기 위하여 몇가지 상업적으로 구할 수 있는 담체를 수집하여 CGTase고정화에 사용할 수 있는 가능성을 조사하였다(Table 1). 이온교환수지 중에서는 강염기성 음이온 교환수지와 흡착수지, 그리고 키토산 유도체

Table 1. Activities of immobilized enzyme on various matrices

Classification	Types	Commercial name	Activity of immobilized enzyme (unit/g-resin)
Adsorption		Diaion HP 20	31
		Diaion SP 207	13
		Amberlite XAD 7*	19
Strong cationic	macroporous	Diaion HPK 25	0
Strong anionic	gel	Diaion SA 12A	5
		Diaion PA 312	14
		Diaion PA 412	8
	porous	Dowex MSA 2	7
		Diaion HPA 25	45
		Diaion HPA 75	54
Weak anionic	macroporous	Diaion WA 20	4
		Diaion WA 30	23
		Duolite A 378	46
Chitosan		Chitopearl BCW 2503	40
		BCW 2603	11
		BCW 3003	32
		BCW 3503	47

\*acryl backbone; other resins except chitosan of styrene backbone. Experimental conditions for immobilization were described in Materials and Methods.

인 Chitopearl™(Fuji Spinning사, 일본)이 효소를 고정화하는 능력이 우수하였다. 그러나 흡착수지(Diaion HP 20)는 스테비오사이드의 정제에 많이 사용되는 수지로 기질 중 스테비오사이드가 흡착되면서 고정화된 효소가 탈착되므로 스테비오사이드를 기질로하는 반응에서 고정화 담체로 사용하기 곤란하였다. 또한 Chitopearl™은 효소 고정화에는 좋으나, 기계적으로 약하고 미생물에 의하여 분해될 수 있으므로 부적합하였다(16). 이온교환수지는 고정화 담체로 재사용이 용이하고, 미생물에 의하여 분해되지 않으므로, 내압성이 우수하다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 음이온교환수지인 Diaion™ HPA75(Mitsubishi Chemical사, 일본)를 담체로 선정하였다. 이 담체는 styrene-divinylbenzene resin으로 효소 고정화에 적합한 다공형의 수지이며(17),  $\beta$ -galactosidase와 fructosyltransferase의 고정화에도 적합한 것으로 보고되어 있다(15, 18).

#### 고정화 조건의 최적화

이온교환수지에 효소를 고정화함에 있어 영향을 주는 인자로는 고정화 시간, pH, 단백질 부하(protein loading), 이온성 성분의 농도 등이 있다. 조효소액과 담체의 접촉 시간에 따른 고정화 효소의 활성변화를 30°C에서 측정할 결과 약 2시간이 경과하면 평형에 이르는 것으로 확인되었기에 고정화 시간은 2시간으로 정하였다(Fig. 1). 평형에 도달하는 시간은 효소의 종류에 따라 차이가 있으며, 예로써  $\beta$ -galactosidase를 Diaion HPA 75에 고정화하는 경우 약 3시간, penicillin acylase를 Amberlite XAD 7에 고정화하는 경우는 약 1,000분으로 보고되어 있다(15, 19).

수용액상의 pH에 따라 단백질의 충전하가 달라지므로 이온결합으로 고정화하는 경우 pH는 고정화 정도에 영향을 준다. 최적의 고정화 pH를 찾기 위하여 pH 4~11범위의 완충액(pH 4~5, citrate buffer; pH 6~7,

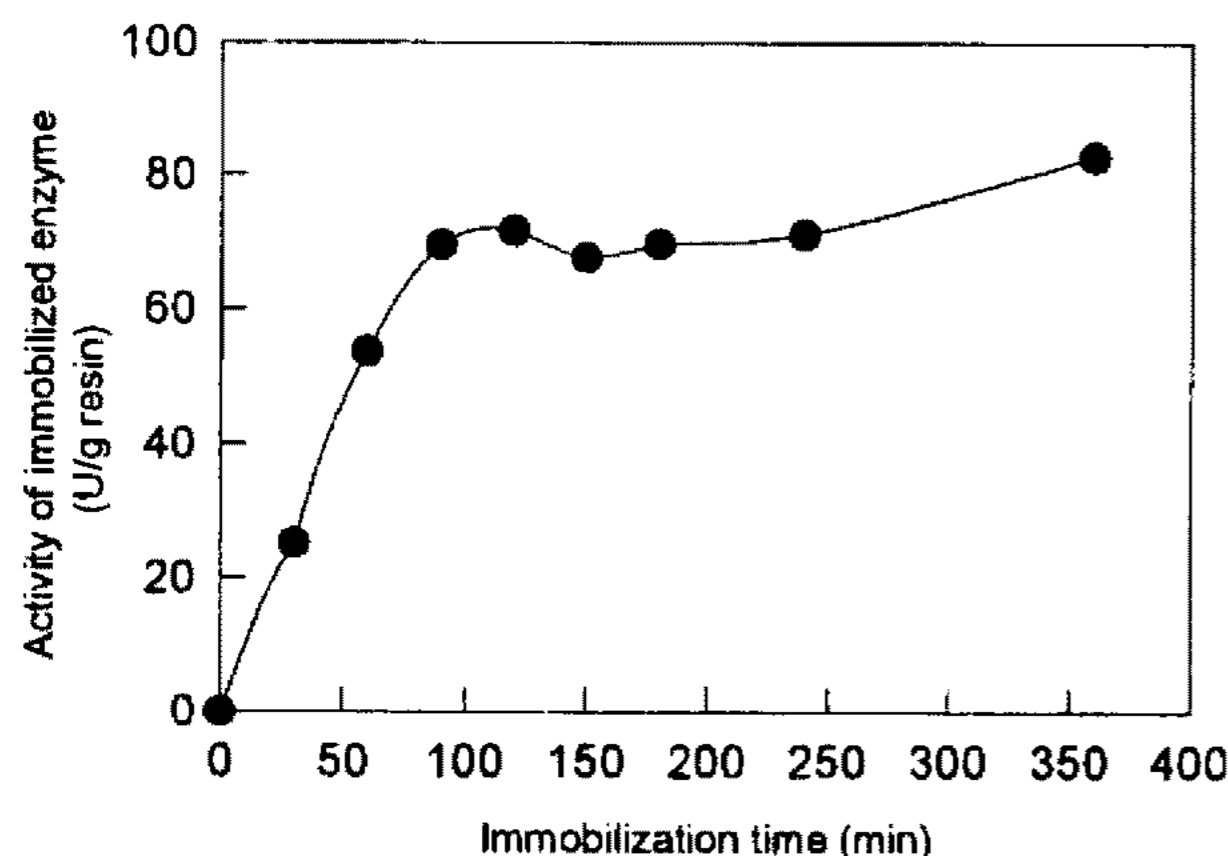


Fig. 1. Time course of cyclodextrin glucanotransferase immobilization. Crude enzyme(150 ml) was mixed with Diaion™ HPA 75(3 g) and incubated with shaking (150 rpm) at 30°C.

phosphate buffer; pH 8~9, Tris-HCl buffer; pH 10~11, glycine-NaOH buffer)을 이용하여 고정화한 후 활성과 단백질 흡착량을 비교하였다(Fig. 2). pH 4 이하에서는 고정화가 실질적으로 일어나지 않았으나 pH 5 이상에서 효소 고정화율이(단백질 흡착량과 효소활성에서 공히) 급격히 증가하였으며, pH 7이상에서는 고정화 효소의 활성이 60 U/g resin으로 거의 일정하였다. *Bacillus*속 유래의 CGTase는 대부분 등전점이 pH 4.0이상 이므로(20, 21), pH 6이상에서는 고정화시 pH의 영향을 크게 받지 않는 것으로 판단되었다.

정제되지 않은 효소를 사용하여 이온교환수지에 고정화하는 경우 조효소액에 존재하는 CGTase이외의 이온성 성분(다른 단백질, 염류 등)도 고정화에 참여하여 효소와 경쟁하게 된다. 이를 입증하기 위하여 조효소액의 농도를 달리하여 고정화를 실시하였다. 조효소액 1~30 ml를 증류수로 50 ml로 희석한 후 담체 2g에 고정화하였다(Fig. 3). 이때 조효소액의 pH는 6.6이었다. 단백질 부하가 증가할수록 단백질의 흡착량은 증가하여 약 22 mg protein/g resin으로 포화되었으나, 고정화 효소의 활성은 단백질 부하량 20 mg protein/g resin조건에서 80 U/g resin으로 최고치를 보였다. 이때 단백질의 흡착량은 14 mg protein/g resin이었다. 정제된 효소를 고정화하는 경우, 고정화 효소의 활성과 단백질의 흡착량은 단백질 부하량에 따라 증가하여 포화되는 것이 일반적인 현상이다. 본 연구에서와 같이 높은 단백질 부하에서 고정화 효소의 활성 감소 현상은 조효소액에 소량으로 존

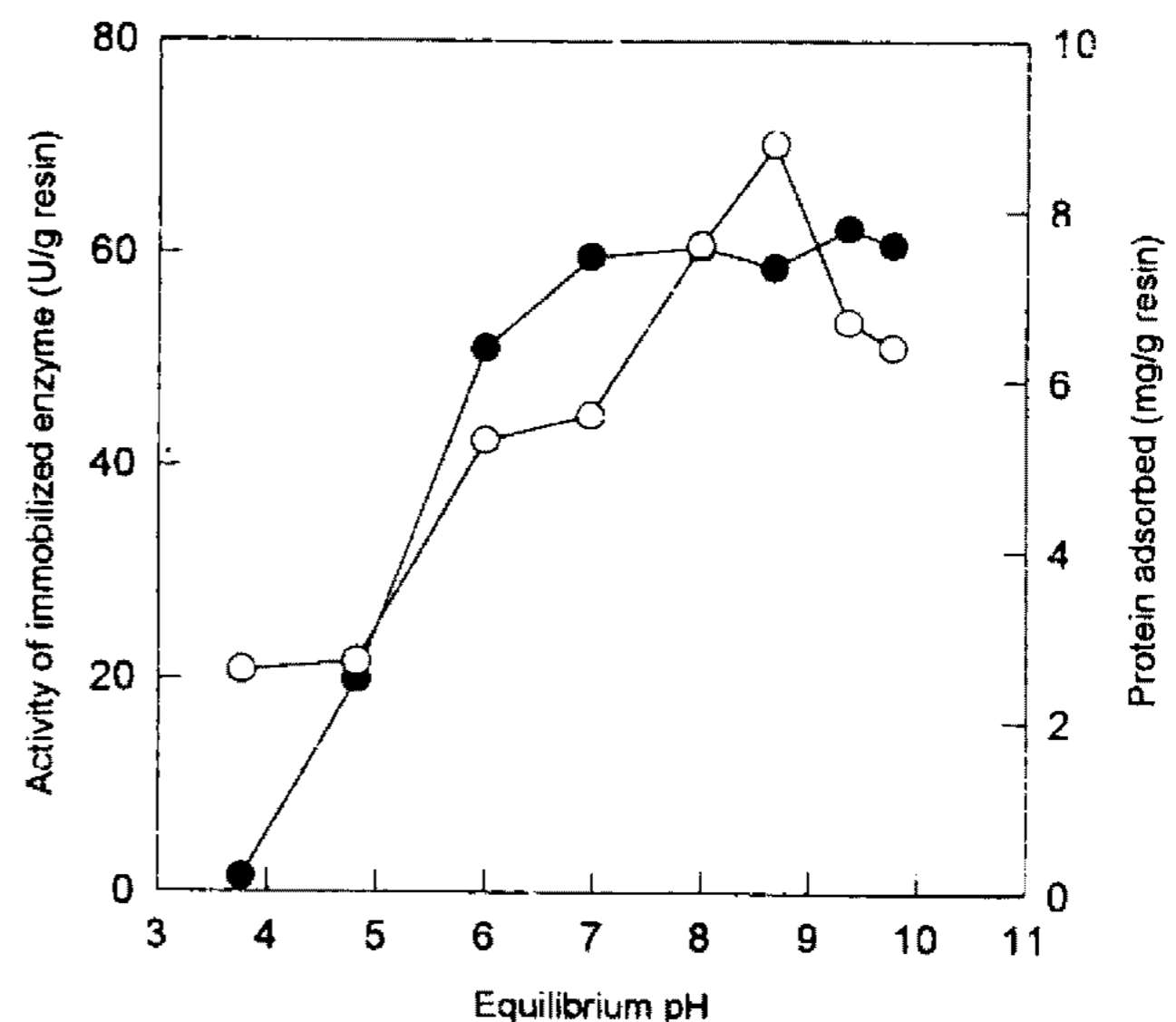
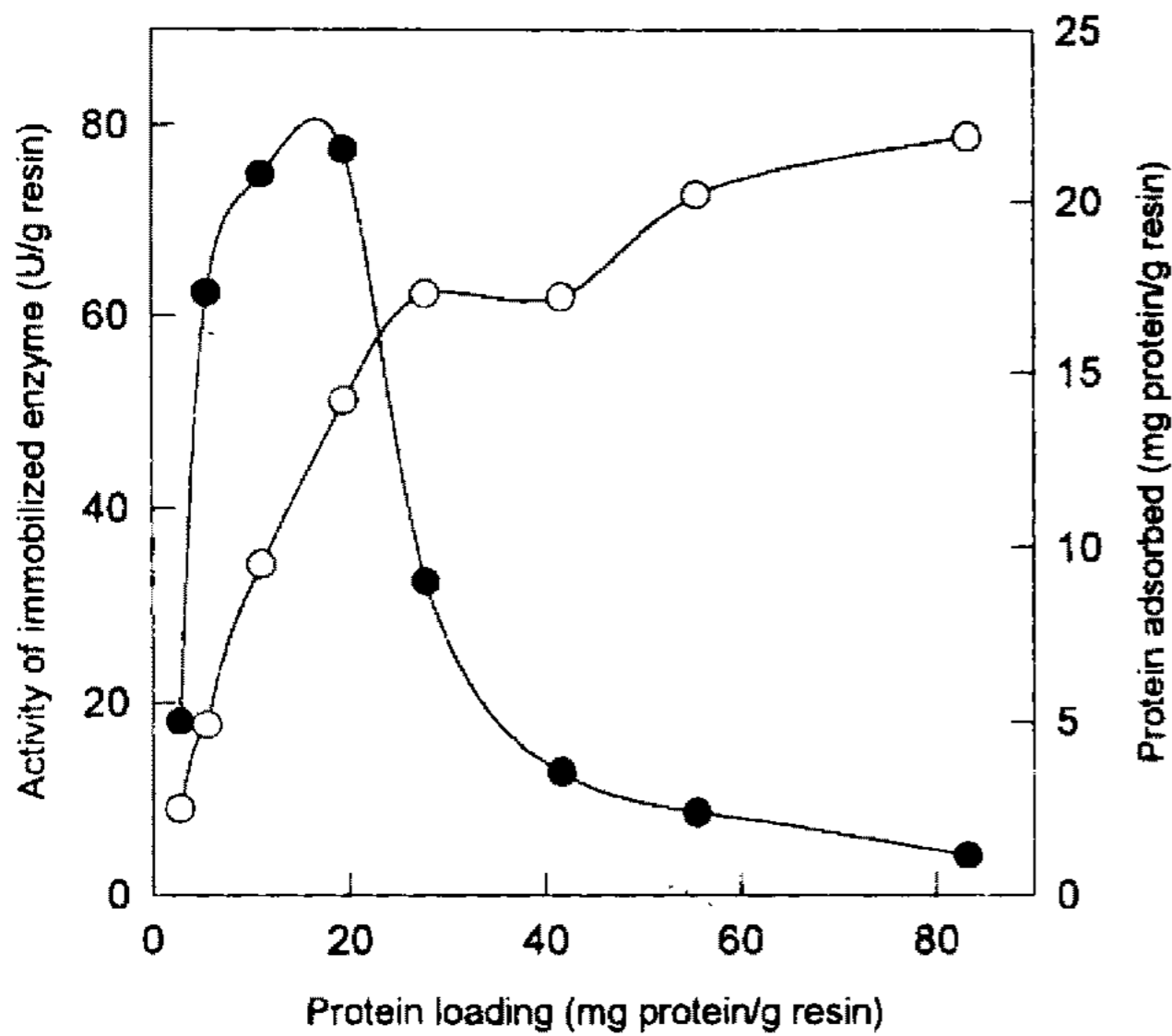


Fig. 2. Effect of equilibrium pH on the activity of immobilized cyclodextrin glucanotransferase (●—●) and on the protein adsorption (○—○).

Diluted enzyme (30 ml) in 50 mM buffers (pH 4~5, citrate buffer; pH 6~7, phosphate buffer; pH 8~9, Tris-HCl buffer; pH 10~11, glycine-NaOH buffer) was mixed with Diaion™ HPA 75 and incubated with shaking(150 rpm) for 2 hr at 30°C.

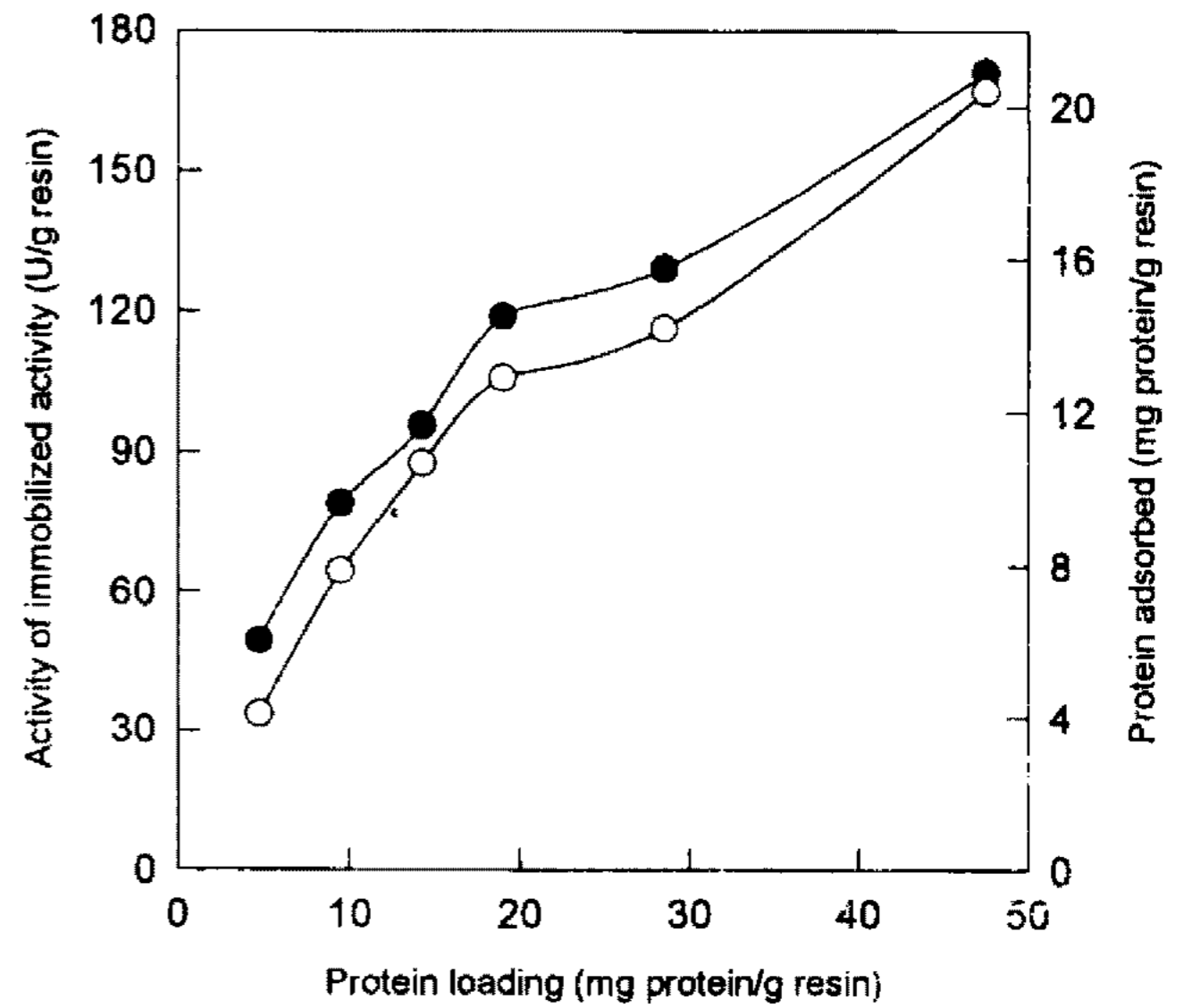


**Fig. 3.** Effect of protein loading on the activity of immobilized cyclodextrin glucanotransferase (●—●) and on the protein adsorption (○—○) before the ultrafiltration of enzyme solution.

Immobilization conditions were the same as in Fig. 2 except that different amounts (1~30 ml) of stock enzyme were diluted with distilled water to 50 ml. Osmolarity, protein concentration and activity of stock enzyme solution were 4.36 Os/Kg, 5.5 g/l and 175 U/ml, respectively.

재하는 분자량이 적은 불순물과 효소보다 우선적으로 결합하는 단백질 등이 원인이라고 보고되었다(22). 즉, 단백질 부하량이 높은 조건에서는 담체에 대한 결합상수가 상대적으로 큰 물질과 효소가 경쟁하여 탈착되어 고정화 효소의 활성이 감소하게 된다. 분자량이 적은 불순물의 영향을 확인하기 위하여 조효소액 200 ml를 증류수로 10배 희석한 후 한외여과막(MWCO 10,000)을 이용하여 분자량이 작은 물질을 제거하고 400 ml로 농축하였다. 불순물의 제거정도를 비교한 결과 osmolarity는 92% 감소(4,360 mOs/Kg → 335 mOs/Kg)하였으며, 단백질량은 25% 감소(1.1 g → 0.82 g)하였던 바, 작은 분자량의 물질들이 상당히 제거되었음을 알 수 있었다. 이렇게 제조한 조효소액 5~50 ml를 이용하여 Fig. 3의 단백질 부하량과 동일한 범위에서 증류수로 50 ml까지 희석한 후 담체 2 g에 고정화하였다(Fig. 4). 이때 조효소액의 pH는 6.7이었다. 예상대로 단백질 부하량이 높은 조건에서도 고정화 효소의 활성은 감소하지 않았으며, 단백질 흡착량과 동일한 양상으로 단백질 부하량의 증가에 따라 증가하면서 점차 포화되었다. 고정화 효소의 비활성(specific activity)은 9~10 U/mg protein으로 모든 실험구간에서 큰 변화가 없었다. Fig. 4의 결과로부터 CGTase가 저 분자량의 물질과 경쟁적이며, 가역적으로 음이온 교환수지에 고정화되는 것을 알 수 있다.

#### 고정화 CGTase의 반응특성



**Fig. 4.** Effect of protein loading on the activity of immobilized cyclodextrin glucanotransferase (●—●) and on the protein adsorption (○—○) after the ultrafiltration of enzyme solution.

Immobilization conditions were the same as in Fig. 2 except that different amounts (1~30 ml) of stock enzyme were diluted with distilled water to 50 ml. Osmolarity, protein concentration and activity of stock enzyme solution were 0.34 Os/Kg, 1.9 g/l and 63.7 U/ml, respectively.

고정화 효소의 당전이 반응에 대한 pH와 온도의 영향을 조사한 결과 유리 효소와 매우 유사하게 최적 pH는 6.0이었고 pH 8.0에서도 최대활성의 90% 이상을 나타내었으며, 50~60°C에서 최고의 활성을 보였다. 고정화 효소의 열안정성을 기질용액(9% 스테비오사이드 혼합물과 21% 덱스트린의 혼합액)에 방치하면서 측정된 결과 50°C에서는 반감기가 약 11일, 60°C에서는 약 1일로 조사되어 고정화 효소를 이용한 연속 전환시 효소 반응기의 온도는 50°C가 적당할 것으로 판단되었다.

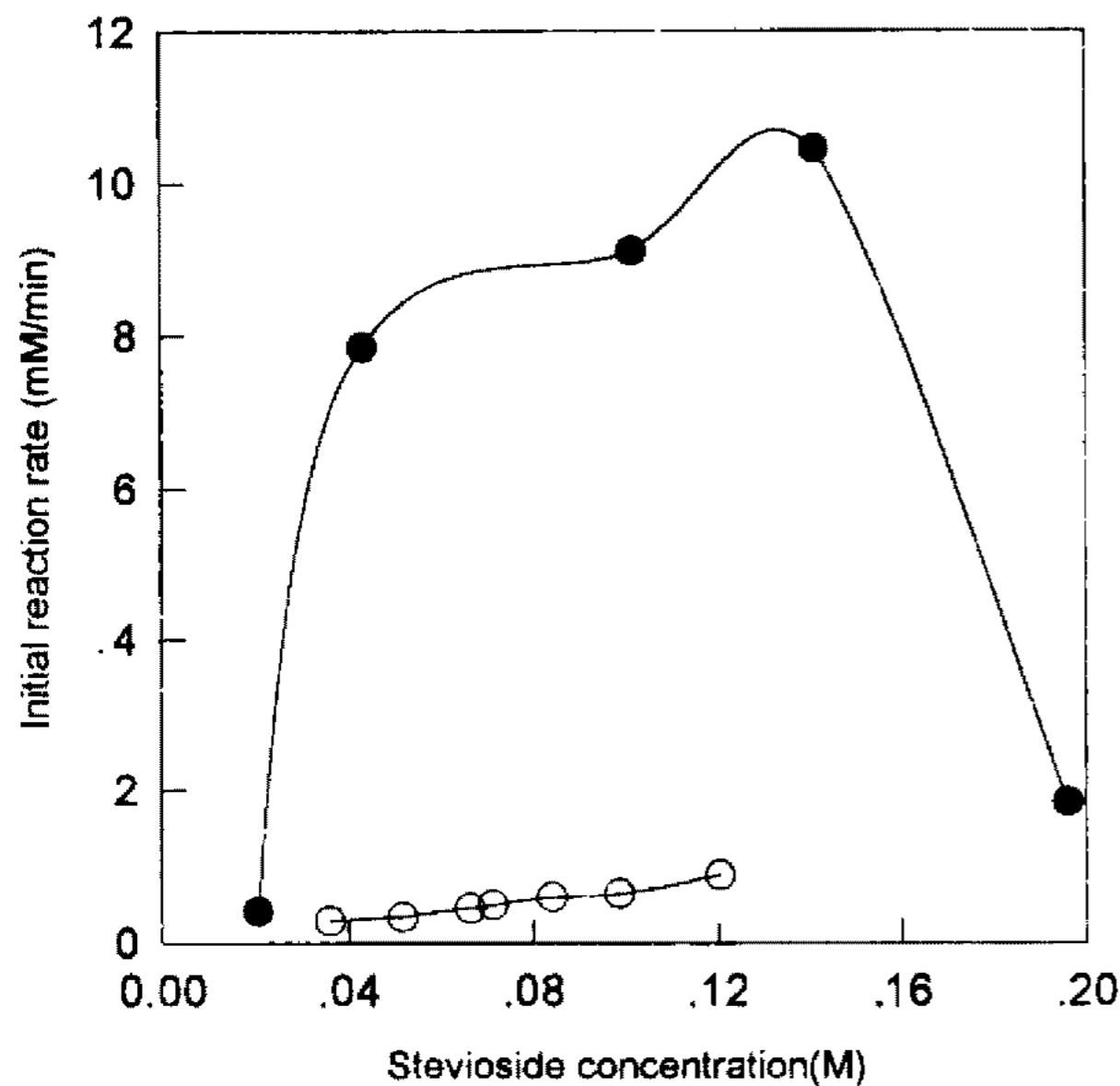
스테비오사이드에 포도당을 전이하는 반응에서 당공여체의 종류와 농도, 수용체와 공여체의 비율에 따라 스테비오사이드의 전환율은 영향을 받는다. 포도당이 주로 α-1,4-glycoside 결합으로 이루어진 전분과 전분의 분해물이 당공여체로 사용될 수 있다. 전분 분해물의 한 종류인 덱스트린은 분해정도에 따라 다양한 DE(dextrose equivalent)값을 나타내므로, 덱스트린 DE값이 스테비오사이드 전환율에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). 스테비오사이드 혼합물과 덱스트린을 5:5로 사용하면 DE값이 작을수록(전분으로부터 분해정도가 작을수록) 전환율은 증가하였다. 기질에 존재하는 포도당 단량체의 양은 동일하여도 glycoside 결합의 수가 많으면 효소의 전이반응이 활발하게 진행됨을 의미한다. DE값이 제일 작은 전분이 가장 효과적인 당공여체이나 용해도와 일정 수준에서 기질의 농도에 비례하는 반응의 생산성을 고려하면 DE≒9인 덱스트린이 현실적으로 적합한 기질이다.



**Table 2. Effect of the dextrose equivalent of dextrin on the conversion of stevioside**

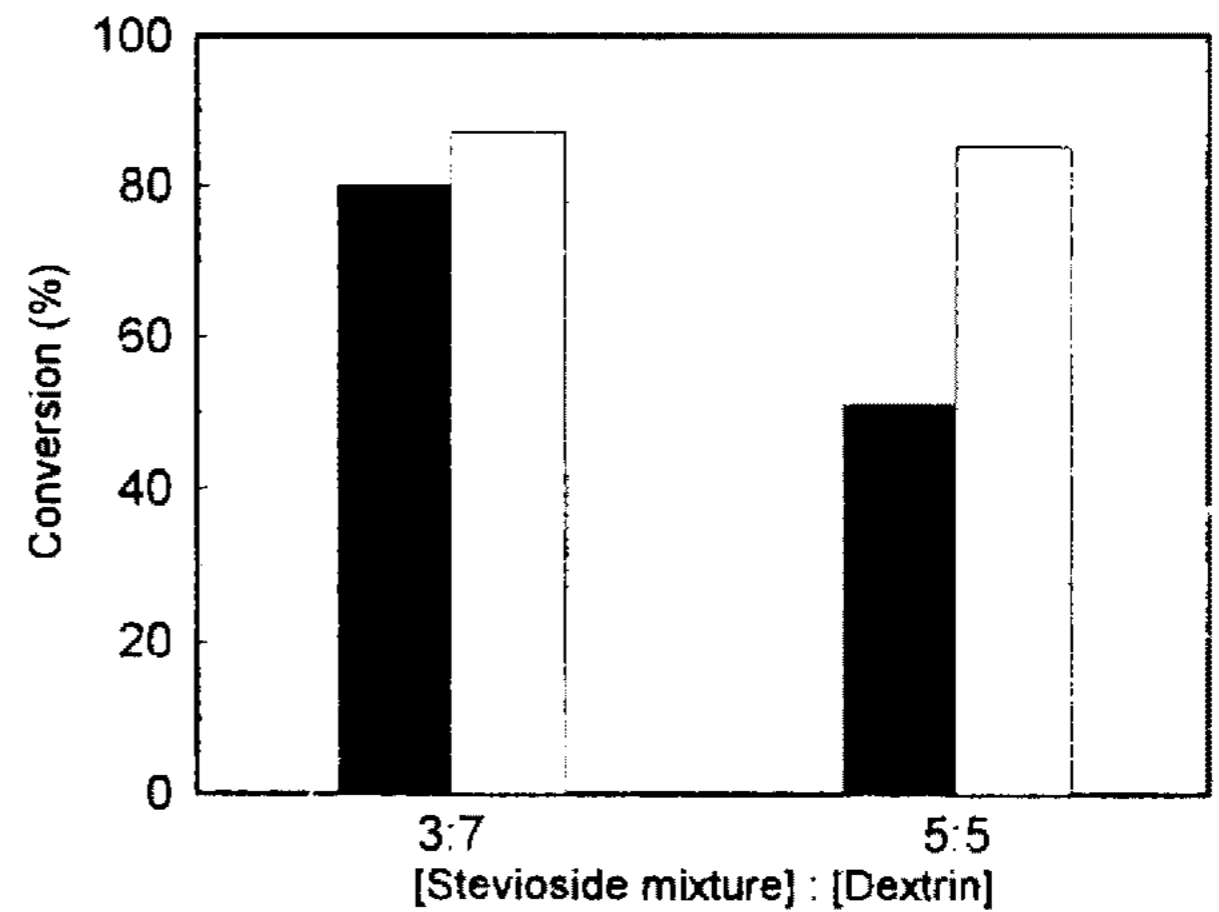
Average dextrose equivalent	Conversion (%)
9	81.1
15	51.0
20	49.8

Immobilized enzyme (1 g) was incubated in 50 ml of substrate solution (20% stevioside mixture+20% dextrin, pH 6.0) at 47°C for 15 hr.

**Fig. 5. Effect of stevioside concentration on transglucosylation initial reaction rate of immobilized cyclodextrin glucanotransferase.**

The ratio of stevioside mixture and dextrin in the substrate solution was 5:5 (●—●) and 3:7 (○—○), respectively.

4~40%의 기질용액(스테비오사이드 혼합물과 DE=9인 덱스트린을 5:5로 혼합) 50 ml에 고정화 효소 1 g을 넣고 50°C에서 초기반응속도를 측정 한 결과 기질농도 30%(스테비오사이드의 농도로 0.15 M) 이상에서는 substrate inhibition이 관찰되었다(Fig. 5). 이때 스테비오사이드 혼합물과 덱스트린의 혼합비가 3:7인 4~40%의 기질을 사용한 결과 반응속도는 스테비오사이드의 농도에 비례 하였으나 1/10 이하로 감소되었다. 당수용체와 공여체의 비율을 5:5와 3:7로 제조하여 24시간 반응시킨 결과 (Fig. 6), 공여체의 비율이 높으면 DE값이 큰 덱스트린을 사용하여도 높은 전이율을 보여, glycoside 결합의 수가 많으면 전환율이 증가하는 결과와 일치하였다. Fig. 5에서 당공여체의 비율이 높으면 초기반응속도가 감소하는 것은 반응초기에 당공여체가 당전이반응이외의 다른 반응에 기질로 우선 사용되기 때문인 것으로 추정된다. 그러나 장시간 반응시키면(Fig. 6) 생성된 중간물질 역시 당공여체로 작용하므로 80% 이상의 전환율로 당전이 스테비오사이드를 얻을 수 있다. 생전분을 당공여체로

**Fig. 6. Effect of dextrin concentration on the conversion of stevioside.**

Immobilized enzyme (3 g) was incubated with 40% substrate solution (50 ml) for 24 hr at 47°C. Closed bar, DE=15; Open bar, DE=9.

사용하는 경우 전분으로부터 cyclodextrin이 먼저 생성되고 생성된 cyclodextrin이 개환되어 스테비오사이드에 당이 전이된다는 보고(11)가 이러한 판단의 근거가 되었다. 이상의 결과로부터 고정화 CGTase를 사용하여 당전이 스테비오사이드를 제조하기 위한 기질은 DE값이 작은( $DE \leq 10$ ) 덱스트린과 스테비오사이드 혼합물을 5:5의 비율로 사용하는 것이 적합하였다.

## 요 약

당전이 스테비오사이드의 제조에 필요한 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)의 고정화 담체를 선별하였다. 다양한 이온교환수지에 고정화하여 활성을 측정한 결과 음이온교환수지인 Diaion™ HPA75(styrene-divinylbenzene resin)가 가장 적합한 담체로 선정되었다. 고정화 효소의 활성을 높이기 위하여 효소 고정화에 영향을 주는 인자들을 최적화하였다. 고정화 시간은 30°C에서 2시간, pH는 6~9가 적당하였다. 단백질 부하가 증가할수록 효소는 분자량이 작은 다른 성분과 경쟁하여 가역적으로 담체에 결합하였다. Diafiltration으로 저분자량의 성분을 제거하고 고정화한 결과 고정화 효소의 활성은 약 180 U/g resin까지 증가하였다. 고정화 CGTase를 이용하여 당전이 스테비오사이드를 제조하기 위한 반응조건은 pH 6.0, 온도 50°C, 기질은 덱스트린 (DE=9) 15%와 스테비오사이드 혼합물 15%를 혼합하여 사용하는 것이 적합하였다.

## 참고문헌

1. 田中 治, 大谷和弘. 1990. 스테비오-올配糖體의酵素工學

- 的甘味改良. *BIO INDUSTRY* 7: 12-19.
2. Mizutani, K., T. Miyata, R. Kasai, O. Tanaka, S. Ogawa and S. Doi. 1989. Study on improvement of sweetness of steviol bisglycosides: selective enzymic transglucosylation of the 13-O-glycosyl moiety. *Agric. Biol. Chem.* 53: 395-398.
  3. Miyake, T. 1980. Process for producing a sweetner. U.S. Patent 4219571.
  4. Kitahata, S., H. Ishikawa, T. Miyata and O. Tanaka. 1989. Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various  $\beta$ -galactosidases. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2923-2928.
  5. Ishikawa, H., S. Kitahata, K. Ohtani, C. Ikuhara and O. Tanaka. 1990. Production of stevioside and rubusoside derivatives by transfructosylation of  $\beta$ -fructofuranosidase. *Agric. Biol. Chem.* 54: 3137-3143.
  6. Kitahata, S., H. Ishikawa, T. Miyata and O. Tanaka. 1989. Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various  $\alpha$ -galactosidases. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2929-2934.
  7. Fukunaga, Y., T. Miyata, N. Nakayasu, K. Mizutani, R. Kasai and O. Tanaka. 1989. Enzymic transglucosylation products of stevioside: separation and sweetness-evaluation. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1603-1607.
  8. Kobayashi, S., K. Kainuma and S. Suzuki. 1978. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase. *Carbohydrate Res.* 61: 229-238.
  9. Hashimoto, H., K. Hara, N. Kuwahara, S. Sakai and N. Yamamoto. 1986. The continuous reaction of cyclodextrins formation by the column method using the immobilized enzyme on ion exchange resins. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 33: 29-33.
  10. Su, C and C. Yang. 1990. A novel method for continuous production of cyclodextrins using an immobilized enzyme system. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 48: 313-323.
  11. 백승걸, 박동찬, 허태린, 이용현. 1994. 생전분을 당공여체로 한 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 stevioside의 당전이 반응 기작. *한국산업미생물학회지* 22: 252-258.
  12. 박동찬, 백승걸, 이용현. 1994. 생전분을 당공여체로 한 stevioside의 당전이 반응의 동력학적 해석. *한국생물공학회지* 9: 108-114.
  13. Kim, M. H., M. J. In, H. J. Cha and Y. J. Yoo. 1996. An empirical rate equation for the fructooligosaccharides-producing reaction catalyzed by  $\beta$ -fructofuranosidase. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 458-463.
  14. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
  15. 인만진, 김민홍, 정진. 1996. 변이주 *Bacillus* sp. A 4442가 생산하는 갈락토스 전이활성이 높은  $\beta$ -galactosidase의 고정화. *한국농화학학회지* 39: 333-337.
  16. Lee, Y. H., S. H. Lee and H. D. Shin. 1991. Performance of column type bioreactor packed with immobilized cyclodextrin glucanotransferase for cyclodextrin production. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1: 63-69.
  17. Mitsubishi Kasei Corporation. 1993. *Diaion<sup>TM</sup> Manual of ion exchange resins and synthetic adsorbent*, pp151. 2nd ed. Nihon Insatsu Kogei, Tokyo, Japan.
  18. Kim, M. H., S. S. Choi, M. J. In, I. S. Choi, M. S. Han and B. S. Lim. 1993. Immobilization of fructosyltransferase on a basic, porous anion-exchange resin. US Patent 5215905.
  19. Carleysmith, S. W., P. Dunnill and M. D. Lilly. 1980. Kinetic behaviour of immobilized penicillin acylase. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 735-756.
  20. Kitahata, S. and S. Okada. 1982. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 29: 7-12.
  21. 박천석, 우의전, 국승욱, 서병철, 박관화, 임훈. 1992. *Bacillus* sp. E1이 생산하는 cyclodextrin glucanotransferase의 정제 및 특성. *한국산업미생물학회지* 20: 156-163.
  22. Sandwick, R. K. and K. J. Schray. 1988. Conformational states of enzymes bound to surfaces. *J. Coll. Interface Sci.* 121: 1-12.

(Received 31 January 1997)